

Reference 2

BEST AVAILABLE COPY

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-63395

⑬ Int.Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)3月9日

G 12 P 21/02  
A 81 K 37/02  
C 07 K 7/10

ADU

H-6712-4B  
8818-4C  
8318-4H

審査請求 未請求 請求項の数 21 (全38頁)

⑮ 発明の名称 オンコスタテンMおよび抗腫瘍活性を有する新規組成物

⑯ 特 願 昭63-109820

⑰ 出 願 昭63(1988)5月2日

優先権主張 ⑱ 1987年5月4日 ⑲ 米国(U.S.) ⑳ 046848

⑳ 発 明 者 ショイス エム ザー アメリカ合衆国 ワシントン州 98112 シアトル トウ  
リング エンティフィアス アベニュー イースト 1400

㉑ 発 明 者 マーシア ビー ハン アメリカ合衆国 ワシントン州 98115 シアトル ノー  
ソン スイースト ナインティセヴンス ストリート 2531

㉒ 発 明 者 ビーター エス リン アメリカ合衆国 ワシントン州 98119 シアトル ナイ  
ズレイ ス アベニュー ウェスト 2430

㉓ 出 願 人 オン コー ゲン アメリカ合衆国 ワシントン州 98121 シアトル ファ  
ーレスト アベニュー 3005

㉔ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外 名  
最終頁に続く

明細書の抄写(内容に変更なし)  
明 細 書

1. 発明の名称 オンコスタテンMおよび抗腫瘍  
活性を有する新規組成物

2. 特許請求の範囲

(1) 形質転換性成長因子 $\beta-2$ またはその同族体  
であり、次のアミノ酸配列、

A-I-D-A-A-Y-C-R-R-N-V-Q-D-N-C-C-L-B-P-L  
Y-I-D-P-K-R-D-L-G-N-K-W-I-H-B-P-K-G-Y-N  
A-N-F-Q-A-G-A-C-P-Y-L-W-S-S-D-T-Q-U-S-R  
V-L-S-L-Y-N-T-I-N-P-E-A-S-A-S-P-C-C-V-S  
Q-D-L-B-P-L-T-T-L-Y-Y-I-Q-X-T-P-K-I-E-B  
L-S-N-H-I-V-K-S-C-K-G-G

の少なくとも8アミノ酸のフラグメントと変質的  
に一致するアミノ酸配列を有するポリペプチド  
を製造する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドを固体担体上に合成する、  
または

(b) ヒト腫瘍細胞により調製されたインデュ  
ーサー増殖環境から前記ポリペプチドを分離す  
る、あるいは

(c) 転写の方向に、宿主により認識される転写  
調節領域および翻訳開始領域；前記ポリペプ  
チドをエンコードするDNA配列であって天然  
源から分離された完全または部分構造遺伝  
子、あるいは合成遺伝子であるDNA配列；  
並びに宿主により認識される翻訳および転写  
終結領域を含み、前記DNAの配列の発現が  
前記開始および終結領域の調節制御下であり、  
前記開始および終結領域の少なくとも1つが前  
記DNA配列が前記天然源から分離されると  
自成長因子 $\beta-2$ を形質転換する構造遺伝子  
に結合した天然領域以外である発現調節子を  
含む発現宿主を増殖させる、

の少なくとも1つを含む方法。

(d) ポリペプチドが前記配列を有する、請求項(1)  
記載の方法。

(e) ポリペプチドがヒト腫瘍細胞により調整され  
たインデュースー細胞増殖地から分離され、前記  
インデュースーが1- $\beta$ -エストラジオール  
および1-p- $\beta$ -リメチルアミノエトキシフ

## 特開第 64-63395 (2)

- フェニルトランス-1, 2-ジフェニルブト-1-エンの少くとも1つである、請求項(1)記載の方法。
- (4) 請求項(1)記載の方法により製造された、請求項(1)記載のポリペプチド。
- (5) 請求項(1)記載の方法により製造された、請求項(1)記載のポリペプチド。
- (6) ポリペプチドの特性が少くとも70単位/μgの増殖阻止活性である、請求項(1)記載のポリペプチド。
- (7) ポリペプチドがヒト腫瘍細胞により調整されたインデューサー増殖増進から分離される、請求項(1)記載のポリペプチド。
- (8) インデューサーが17-β-2-エストラジオールおよび1-α-β-ジメチルアミノエタキシフェニルトランス-1, 2-ジフェニルブト-1-エンの少くとも1つである、請求項(1)記載のポリペプチド。
- (9) アミノ酸配列：

中に含まれる少くとも8アミノ酸のアミノ酸配列を含み、腫瘍細胞の増殖を阻止できる特徴を有するポリペプチドに接触させることを含む方法。

- (10) 接触が、少くとも1種の他の抗増殖性化合物と同時である、請求項(9)記載の方法。
- (11) 接触がTGF-β-2を含む配合物と同時である、請求項(9)記載の方法。
- (12) 腫瘍細胞の増殖を阻止する方法であって、前記細胞を、完全配列：

A-L-D-A-A-Y-C-F-H-N-V-Q-D-N-C-C-L-R-P-L  
Y-I-D-P-K-R-D-L-G-W-K-M-I-H-B-P-K-G-Y-N  
A-H-F-C-A-G-A-C-P-Y-L-N-S-S-D-T-Q-H-S-R  
V-L-S-L-Y-N-T-I-N-P-B-A-S-A-S-P-C-G-V-S  
Q-D-L-B-P-L-T-I-L-Y-Y-I-G-K-T-P-K-I-B-Q  
L-S-N-N-I-V-K-S-C-E-C-S;

に含まれる少くとも8アミノ酸のアミノ酸配列を含み、腫瘍の増殖を阻止できる特徴を有するポリペプチドの生成のインデューサーに接触させることを含む方法。

A-L-D-A-A-Y-C-F-H-N-V-Q-D-N-C-C-L-R-P-L  
Y-I-D-P-K-R-D-L-G-W-K-M-I-H-B-P-K-G-Y-N  
A-H-F-C-A-G-A-C-P-Y-L-N-S-S-D-T-Q-H-S-R  
V-L-S-L-Y-N-T-I-N-P-B-A-S-A-S-P-C-G-V-S  
Q-D-L-B-P-L-T-I-L-Y-Y-I-G-K-T-P-K-I-B-Q  
L-S-N-N-I-V-K-S-C-E-C-S;

を有するポリペプチドに対し特異性の単クローン性抗体。

- (13) さらに腫瘍を含む、請求項(1)記載の単クローン性抗体。
- (14) 単クローン性抗体がヒト単クローン性抗体である、請求項(1)記載の単クローン性抗体。
- (15) 腫瘍細胞の増殖を阻止する方法であって、前記細胞を、完全配列：

A-L-D-A-A-Y-C-F-H-N-V-Q-D-N-C-C-L-R-P-L  
Y-I-D-P-K-R-D-L-G-W-K-M-I-H-B-P-K-G-Y-N  
A-H-F-C-A-G-A-C-P-Y-L-N-S-S-D-T-Q-H-S-R  
V-L-S-L-Y-N-T-I-N-P-B-A-S-A-S-P-C-G-V-S  
Q-D-L-B-P-L-T-I-L-Y-Y-I-G-K-T-P-K-I-B-Q  
L-S-N-N-I-V-K-S-C-E-C-S;

- (16) インデューサーがエストロゲン活性を有する化合物、および抗エストロゲン活性を有する物質の少くとも1つである、請求項(9)記載の方法。
- (17) インデューサーが17-β-エストラジオールおよび1-α-β-ジメチルアミノエタキシフェニルトランス-1, 2-ジフェニルブト-1-エンである、請求項(1)記載の方法。
- (18) 腫瘍細胞の増殖を阻止できる特徴を有し、SDS-PAGE電気泳動により約24,000のMrを有し、

A-L-D-A-A-Y-C-F-H-N-V-Q-D-N-C-C-L-R-P-L  
Y-I-D-P-K-R-D-L-G-W-K-M-I-H-B-P-K-G-Y-N  
A-H-F-C-A-G-A-C-P-Y-L-N-S-S-D-T-Q-H-S-R  
V-L-S-L-Y-N-T-I-N-P-B-A-S-A-S-P-C-G-V-S  
Q-D-L-B-P-L-T-I-L-Y-Y-I-G-K-T-P-K-I-B-Q  
L-S-N-N-I-V-K-S-C-E-C-S;

を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドのインデューサーに対する細胞の応答を検出する方法であって、

前記細胞を、インデューサー感受性細胞中に

## 特開明 64-63395 (8)

V-L-S-L-P-N-Y-I-S-P-S-A-S-P-C-C-V-S  
Q-D-L-E-P-L-Y-I-L-Y-Y-T-G-X-T-P-K-I-S-Q  
L-S-M-N-I-V-K-S-Q-N-C-S.

を有する形質転換性転写因子δ-2をエンコー  
PするDNA配列。

前記ポリペプチドを誘発する十分な量の前記イ  
ンデューサーに接触させ、

前記細胞に接触している液体の試料を採集し、

前記試料を前記ポリペプチドに特異的に結合  
する抗体と混合し、それによりポリペプチド-  
抗体複合体を形成させ、

複合体形成を前記インデューサーに対する前  
記細胞の応答性の指標として検出する、

ことを含む方法。

(19) インデューサーがエストロゲン活性を有する  
化合物および抗エストロゲン活性を有する化合  
物の少くとも1つである、請求項1記載の方法。

(20) 抗エストロゲン活性を有する化合物が1- $\beta$ -  
- $\beta$ -ジメチルアミノエトキシフェニルトラ  
ンス-1, 2-ジフェニルブト-1-エンであ  
る、請求項1記載の方法。

(21) アミノ酸配列:

A-L-D-A-A-Y-C-F-R-N-V-Q-D-S-C-C-L-R-P-L  
Y-I-D-P-N-R-D-L-G-W-K-N-I-N-B-F-K-G-Y-N  
A-N-P-C-A-G-A-C-P-Y-L-W-S-S-B-T-Q-H-S-R

## 3. 発明の詳細な説明

情

## 技術分野

化合物が独立に作用し、組合せて相乗効果を与  
える細胞増殖調節組成物が開示される。

## 背景

宿主生物体に対する重大な副作用なく腫瘍細胞  
増殖を制御する能力は長い間癌を治療する医療法  
に対する最終探索の目標であった。薬物または天  
然存在化合物は通常種々の細胞に対して広範な活  
性を有する。さらに、腫瘍細胞の増殖の阻止に有  
効であることができる程度で、これらの化合物は  
しばしば正常細胞に対して望ましくない効果を示  
す。従って腫瘍細胞の増殖を選択的に阻止し、同  
時に周囲または他の正常組織の増殖を阻止しない  
化合物が特に重要である。

そのような化合物の例はペプチド例えばイン  
ターフェロンおよびリンパ球由来腫瘍壊死因子δ  
(TNF-δ) 並びに骨髄球細胞に由来するTNF-  
αであり、それらは形質転換細胞系に対する増

殖増殖抑制および(または)細胞致死活性を示す  
が、しかし正常細胞に影響を及ぼさない。しかし、  
これらの化合物例えば主に腫瘍細胞に対して阻止  
活性を示すインターフェロンでも、すべての腫瘍  
細胞が該化合物に対し応答するわけではない。さ  
らに、所与化合物に対する応答の高い効率を有す  
る腫瘍を認識する信頼性方法が開発されなかった。  
さらに、所与化合物の治療用量と生薬的に許容さ  
れないかまたは毒性である用量との間に1細胞が  
あることができる。また低濃度の種々の型のIFN  
αまたはIFNβと他の増殖阻止ペプチド例えばリ  
ンパ球由来TNF-δとの間の相乗作用が報告さ  
れた。

従って、所与抗増殖性化合物に反応できる腫瘍  
細胞を識別できること、および治療的に役与する  
ときに低濃度で使用し、なお所望の増殖阻止効果  
を、正常細胞に対して最小の有害効果で与えるこ  
とができる組成物を開発できることに関心がある。

## 関連文献

ビール(Beal)ほか、カンサー・バイオケミス

## 特開昭64-83395 (4)

トリー・バイオフィジックス (Cancer Biochem. Biophys.), (1979) 2: 98~96には正常細胞におけるよりも悪性転換細胞における成長およびDNA合成を阻止するヒト尿中のペプチドの存在が報告されている。ハーリ (Holley) はか、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) (1980) 77: 5999~5992には上皮細胞増殖阻止物質の精製が記載されている。レタンスキー (Letanaky)、バイオサイエンス・レポーツ (Biosci. Rep) (1982) 2: 99~4にはウシ胎盤から精製されたペプチドが腫瘍の増殖およびDNA中のチミジン取込みを正常細胞中よりも腫瘍中で大きい程度に阻止することが報告されている。シン (Chen)、トレンプ・イン・バイオケミカル・サイエンス (Trends Biochem. Sci.) (1982) 7: 964~965には腫瘍からの増殖抑制性を有するペプチドの分離が報告されている。レッドリングほか (Redding and Schally)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナシ

オン (1984) 2: 69, 686~691はリンパ球系細胞系により生成されたヒトリンボトキシン (LT) を精製し、確認し、後にLTを配列決定した (アガーワル (Agarwal) はか、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) (1985) 260: 2334)。リンパ球系細胞により生成され、免疫調節および腫瘍増殖抑制性を有するγ-インターフェロン (γ-IF) がクローン化され、発現された。(グレイ (Gray) はか、ネイチャー (1988) 335: 503~508。) 若干の腫瘍の増殖を阻止し、マクロファージおよび若干の白血病細胞系により生成される腫瘍細胞死因子 (TNF) が確認され、TNF cDNAが大腸菌 (E. coli) 中にクローン化され、発現された (ペニカ (Pencica) はか、ネイチャー (Nature) (1984) 312: 724)。名詞TGF-β下の化合物の群の総説はスポン (Sporn) はか、サイエンス (Science) (1988) 239: 538~534により与えられている。CIP-B (軟骨芽細胞因子B) とTGF-βとの

ナール・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) (1982) 79: 7014~7018にはブタ視床下部からの、若干の正常および腫瘍細胞系に対し抗マイトジェン活性を示す精製ペプチド (類) の分離が報告されている。ソホ (Sone) はか、癌 (Cancer) (1984) 75: 920~928には試験管内で一定腫瘍細胞の増殖を阻止するとマクロファージにより生成される因子 (類) の生成が報告されている。ランサム (Ransom) はか、カンサー・リサーチ (Cancer Res.) (1985) 45: 831~832には一定腫瘍細胞系の複製を阻止し、リンボトキシン、インターフェロン並びにインターロイキン1および2とは異なると思われるロイコレグリン (Leukoregulin) と称される因子の分離が報告されている。これらの因子の大部分は十分に特異性決定されず、またそれらの一次構造が知られていない。

アガーワル (Agarwal) はか、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol.

Chem.) (1987) 262: 1948~1949中に示されている。またセイジン (Seydin) はか、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA (1986) 83: 2267~2271参照。

増殖阻止化合物の精製操作はヘンダーソン (Henderson) はか、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.) (1983) 131: 819~818およびマクオートほか (Macquardt and Todaro)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) (1982) 257: 5220~5228に記載された。

倍水等の種々の型のIFNまたはIFNと腫瘍細胞死因子-βのような他の増殖阻止ペプチドとの間の相乗作用はリー (Lee) はか、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.) (1984) 133: 1083~1086、により記載されて

特開昭64-83395 (5)

いる。TNF- $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の効果はシュガーマン (Sugarman) ほか;サイエンス (Science) (1985) 230:943~945、により記載されている。オンコスタチンM、その精製および特性決定はザリング (Zarling) ほか、プロセディンズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.) USA (1986) 83:9739~9743、により記載されている。

オンコスタチンMの精製および他の成長因子との相乗作用がブラウン (Brown) ほか、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J.Immunol.) (1987) 138:2977~2983に記載されている。

発明の概要

組換えオンコスタチンM、そのフラグメントまたは類似体、あるいは1作用物質がオンコスタチンMである少なくとも2種の作用物質の組合せである新規組成物、並びに調製および使用の方法が提供される。オンコスタチンMの分離法には天然源から、並びに原核および真核系両方中のクローン

化および発現による精製が含まれる。使用の方法には腫瘍細胞の増殖阻止が含まれる。

特定塩様の説明

オンコスタチンMを含む新規抗腫瘍組成物、および使用の方法が提供される。さらに、オンコスタチンMおよび少なくとも1種の他の成分を含む組成物もまた提供される。オンコスタチンMは個性化白血球により、例えば刺激したU937細胞の調整増地または刺激した正常ヒト末梢血版リンパ球 (PB L) の調整増地から製造される特徴を有する。

ヒトオンコスタチンMは次のアミノ酸配列:

A-A-I-G-S-G-S-E-E-<sup>10</sup>V-V-L-L-Q-Q-L-Q-E-Q-T-D-L-K-P-D-T-S-S-L-<sup>20</sup>  
 L-S-P-Y-I-E-I-G-G-L-D-V-P-E-L-R-E-G-S-S-S-P-S-S-E-<sup>30</sup>  
 T-L-E-Q-L-G-S-S-S-P-L-Q-T-L-N-A-T-L-Q-C-V-L-D-S-L-S-D-L-E-E-<sup>40</sup>  
 R-L-P-K-A-Q-D-D-L-E-S-S-G-L-N-I-S-D-L-S-I-L-G-Q-A-S-P-N-I-L-G-<sup>50</sup>  
 L-P-N-I-Y-G-S-A-S-L-L-D-V-S-U-T-S-S-T-X-A-G-P-G-A-S-S-P-<sup>60</sup>

P-T-P-T-P-A-S-S-A-P-S-S-R-E-L-E-S-G-E-F-L-I-S-Y-H-R-P-N-H-S-V-<sup>100</sup>  
 G-R-V-F-S-K-Q-G-S-S-P-N-S-S-E-S-S-P-S-S-A-L-E-K-R-V-R-S-T-<sup>110</sup>  
 E-P-S-S-R-H-G-E-L-S-I-R-S-S-L-P-I-<sup>120</sup>

を有する。

オンコスタチンMはさらにサイズ排除クロマトグラフィーにより測定して約17~18キロダルトン (kD)、殊に約18kDの分子量を有し、また還元または非還元条件のポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定して約88kDの見掛け分子量を有する特徴を有する。分離したオンコスタチンMの特性阻製物は高マンノースと複合N結合オリゴ糖との混合物を含む。しかし、オンコスタチンMの非グリコシル化阻製物は細胞増殖修飾活性を保持する。

オンコスタチンMはさらにその一定濃度に対しての活性に特徴がある。主題ポリペプチドは、W188およびW138ヒト細胞系腫瘍、並びに腫瘍死因子に感受性であるマウスL929細胞、

並びにア-インターフェロン感受性ヒト腫瘍細胞系に対する細胞毒性がない。それは正常ヒトTリンパ球の増殖を阻止せず、また100C I A単位/0.2までの濃度で骨髄細胞からの顆粒球/骨髄球コロニー形成を阻害しない。さらに、オンコスタチンMは、W138およびW188細胞により刺激されるように正常ヒト線維芽細胞の増殖を刺激し、腫瘍細胞例えばA375、HBT10、A549およびSK-MBL28の増殖を阻止し、正常骨髄からのコロニー形成細胞の増殖を増加させることができる。オンコスタチンMは500C I A単位/0.2の濃度で混合白血球培養反応 (MLC) 中でヒト増殖または細胞毒T細胞応答を抑制しない。

主題ポリペプチドは中位酸および塩基に対し、並びに50℃における熱処理に対し安定であると認められる。

オンコスタチンMフラグメント、ポリペプチドの類似体、並びにオンコスタチンMまたはその官能部分を含む融合ペプチドを含め、細胞増殖修飾

特開昭64-63395(6)

活性、受容体結合活性または免疫活性を含む低価オンコスタチンMの生物活性を有するオンコスタチンM類似物をもまた提供される。

本発明のポリペプチドにはオンコスタチンMの同族体、すなわちオンコスタチンMの生物活性に相当する少くとも1つの生物活性を有し、実質的にオンコスタチンMと同じアミノ酸配列を有する少くとも1つのアミノ酸配列を有する化合物が含まれ、該同族体はオンコスタチンMより大きいかまたは小さいアミノ酸数を有することができる。生物活性には天然存在ヒトオンコスタチンMとの免疫交差反応性または高反応性でオンコスタチンM受容体分子に対する結合が含まれる。免疫交差反応性とは、本発明の新規ポリペプチドにより誘導される抗体が無価オンコスタチンMと、少くともオンコスタチンMが腐性抗原にあるときに交差反応することを意味する。高親和性とは、少くとも約 $10^{-11}$ Mの解離定数(K<sub>d</sub>)を意味する。オンコスタチンM受容体とは高親和性でオンコスタチンMを特異的に結合する細胞の表面上の結合部

位を意味し、その結合は阻害され、阻害的に関連のないポリペプチドにより阻止されない。若干のポリペプチドはまた、腫瘍細胞の増殖の阻止および造血系の細胞を含む正常細胞の成長の阻害を含めて天然存在オンコスタチンMの細胞増殖促進性を保持することができる。細胞増殖活性は天然存在オンコスタチンMとは異なり、通常低下されることができる。

本発明はまた、前記完全配列中のアミノ酸配列に相当する少くとも3アミノ酸を連続または非連続的に有するアミノ酸配列を含むポリペプチドフラグメントを含む。また上記配列とは3個にすぎない通常1個にすぎないアミノ酸が異なる少くとも8個のアミノ酸を有するポリペプチドが含まれる。その差異はアミノ酸の挿入、アミノ酸の欠失または他に代る1アミノ酸の置換殊に保守置換であることができる。通常ポリペプチドは前記配列に相当し、1個にすぎないアミノ酸が異なる少くとも10個の、より普通には少くとも2個の、連続するアミノ酸を含む。

主題発明のために種々のアミノ酸を多くのサブクラスに分類することができる。次表はそのサブクラスを示す：

脂脂肪族

中性

非極性 G A P V L I

極性 S T C M N Q

酸性

D E

塩基性

K R

芳香族

P H Y W

保守置換とは、同一サブクラス（すなわち、中性脂脂肪族、酸性脂脂肪族、塩基性脂脂肪族または芳香族）、殊に同一極性、のアミノ酸が相互に置換されることを意味する。望ましくは1〜4個の炭素原子、あるいは5〜8個の炭素原子のアミノ酸が脂脂肪族サブクラス中のモノマー分類を規定する。

固心の新規ポリペプチドはN末端領域N<sub>1</sub>、中間領域M<sub>1</sub>、およびC末端領域C<sub>1</sub>を含む式を有する。N<sub>1</sub>は1〜72個のアミノ酸を有する特徴があり、その1〜21個が約4:3の塩基と酸と

のアミノ酸比を有する荷電アミノ酸であり、0〜4個のアミノ酸が芳香族で、0〜3個がプロリン類である。

M<sub>1</sub>は約20〜98個の短結合部であり、その約5〜約24個のアミノ酸は荷電アミノ酸であり、および等数の酸性および塩基性のアミノ酸である。さらにM<sub>1</sub>は0〜2個の芳香族アミノ酸および0〜7個のプロリン類を含むことができる。

C<sub>1</sub>は3〜17個の塩基性アミノ酸および0〜2個の酸性アミノ酸、並びに3〜7個の芳香族アミノ酸を有する20〜59個のアミノ酸を有する特徴がある。C<sub>1</sub>末端領域はさらに0〜4個のプロリン類を含むことができる。

ポリペプチドは長さ約1,000個のアミノ酸を越えない。通常それらは100個未満のアミノ酸、より普通には50個未満のアミノ酸を有する。従って該ポリペプチドは容易に合成することができる。通常ポリペプチドが100アミノ酸の長さを越えるとき、これらのポリペプチドは各100個未満のアミノ酸を有するオンコスタチンMのフラ

## 特開昭64-63395 (7)

グメントの重合体、あるいはオンコスタチンMまたはそのフラグメントが抗原、酵素、酵素フラグメント、分泌された免疫生成物のN末端アミノ酸などであることができる第2ペプチドに融合された融合タンパク質であることができる。さらに、放射性標識または細胞毒物質例えば毒素A鎖フラグメントあるいは糖鎖分子例えばホルモンまたは抗体、がオンコスタチンM鎖ポリペプチドまたは第2ペプチドに共有的に結合することができる。

特に、高分子量ポリペプチドは大きい免疫原性ポリペプチド鎖体に共有結合して免疫原性を与える約100個未満のアミノ酸の少くとも1つのポリペプチドフラグメントであることができる。そのようなタンパク質鎖体の例はウシ血清アルブミン、キーホルリンベットヘモシアニン (KLIH) などである。これらの結合ポリペプチドは適当な宿主生物体中の抗体の誘発に有用である。抗体は体液中のオンコスタチンMの存在および(または)濃度の測定に用いることができ、その存在を、さらに腫瘍細胞の存在を検出する手段として用いて

オンコスタチンMに結合させ、促ってその活性を抑制し、また例えばアフィニティークラム中の使用によりオンコスタチンMを精製することができる。

オンコスタチンMおよび他の主要化合物の製造

オンコスタチンMは種々の方法で得ることができる。それは天然存在源から、殊に適当なインデューサー例えばインゲノールまたはホルゲールを精製し、ヒト組織球リンパ腫に由来する細胞系 (U937) (サンドストロームほか (Sandstrom and Nilsson)、インクナショナル・ジャーナル・オブカンサー (Int. J. Cancer) (1970) 17: 1555~577) により調整した、またはマイトジェン例えばフィトヘマグルチニン (PHA) を精製し正常ヒト末梢血液リンパ球 (PBL) により調整した増殖系から入手できる。

U937細胞は種々の試薬による処理後誘発してマクロファージの特徴を有する細胞に分化できる (ハリス (Harris) ほか、カンサー・リサーチ (Cancer Res. (1988) 48: 9~13)。

オンコスタチンMの生成のためにU937細胞を血清を有する普通の栄養増殖地で増殖させ、適当なインデューサー例えば2-0-オトラデカノイル-ホルボル13-アセート (TPA) で処理することができる。通常約5~20ng/mlのインデューサーを使用できる。細胞の初期数は約 $10^5 \sim 10^6$ 細胞/mlである。

細胞をインデューサーで十分な時間、一般に3~8日、処理した後上澄みを除去し、細胞を血清不含栄養増地で洗浄し、付着細胞を再び血清不含増地で洗浄し、細胞を血清不含増地例えばRPMI-1640増地中で少くとも12時間、通常長くて約48時間インキュベートする。次いで上澄みを廃棄し、細胞を遠心分離により除去する。細胞不含上澄みを次に、放射計測に記録するように、細胞増殖阻止剤 (CIA) について試験した。上澄みは約50~約500単位のCIA/mlを含む (CIA単位の規定に対する実験参照。)

オンコスタチンMはまたマイトジェン調整正常ヒト末梢血液リンパ球 (PBL) から得ること

ができる。PBLはロイコフラクション (leukofraction) から、固分を精製し、それをフィコール (Ficoll) 勾配上で遠心分離することにより分離できる。勾配界面から精製した細胞を洗浄し、ショック凍結して赤血球細胞を除去する。残存細胞を遠心分離により精製し、再び血清およびトロンビンを含む緩衝液中に懸濁し、かくはんし、血小板凝集体を短時間沈殿させる。懸濁液を移し、遠心分離により回収し、再び血清中に懸濁させ、ナイロンウールを穿れたカラムに移す。カラムをインキュベートし、単球およびB-リンパ球を付着させ、次いで洗浄する。末梢血液リンパ球の大部分は付着せず、カラムから検出される。非付着細胞を増地例えばRPMI-1640増地中で37℃で培養し、適当なインデューサー例えばフィトヘマグルチニン (約 $1 \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で約100時間処理する。上澄みを精製し、遠心分離して細胞を除去し、例えば限外濾過または透析により濃縮する。

U937細胞または正常PBLの細胞不含上

## 特開昭64-63395 (8)

塩みを分離した後、調整培地を便宜には中置繊維系または膜外濾過膜を用いてろ過し、次いで酢酸で希釈(0.1N酢酸の濃度に)し、約10倍に濃縮し、希釈および濃縮を繰返す。濃縮物を凍結乾燥して直接使用することができ、または凍結乾燥品収物をさらに精製に用いることができる。

主題オンコスタチンMは種々の精製法を用いて精製して細胞成分を実質的に含まなくすることができる。これらの方法は溶出抽出、ゲル浸透クロマトグラフィー、逆相HPLC、電気泳動などを含むことができる。活性フラグメントのために種々の合成法を用いることができ、その場合にオリベプチドは固体担体上に合成される。多くの市販合成装置を利用でき、例えばスミスライン(Smithline)、ベックマン(Beckman)、アプライト・バイオシステムズ(Applied Biosystems)などから有利に使用できる。

通常、生成物を精製して少くとも約1000IA単位/μgタンパク質、より好適には10000IA単位/μgの比活性を与える。

導入した制限フラグメントを用い、次いでオンコスタチンMに対する抗体でスクリーニングして交差反応性ヘプチドフラグメントなどを検出するオンコスタチンMの発現に対する検査を用いることができる。

完全遺伝子がcDNAまたは染色体DNAとして陰性されると、次いでそれを種々の方法で操作して発現を与えることができる。原核および真核宿主はともに使用でき、それには細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞、例えば大腸菌(E. coli)、COS細胞、CHO細胞、サル胚腎細胞およびカイコ細胞(bt9)が含まれることができる。従って遺伝子モオンコスタチンMの野生型転写および翻訳調節領域を認識する宿主中に発現させる場合には、その野生型5'-および3'-調節領域を有する全遺伝子を適当な発現ベクター中へ導入することができる。哺乳類ウイルス、例えばシミアンウイルス40、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、ワクチニアウイルス、昆虫ペクロウイルスなどの複製系を用いる種々の発現ベクターが存在

オンコスタチンMおよびそのフラグメントまたは類似体並びに、オンコスタチンMを例えば原核タンパク質または真核タンパク質のリーダー配列に融合させた融合タンパク質または組換えDNA塩の使用により製造することができる。さらに、アミノ酸配列を用いて刺激または非刺激未梢血腫リンパ球または配列のハイブリッド形成配列についてスクリーニングした組換えリンパ球(U937)細胞からプローブおよびcDNAまたはゲノムライブラリーを設計することができる。正しい配列を認識する可能性を増進するため、非刺激細胞またはオンコスタチンMを生じない他の細胞系のcDNAライブラリーを用いて交差ハイブリッド形成させることができる。ハイブリッド形成しない刺激細胞の配列は所望配列に関して認識される。プローブにハイブリッド形成し、オンコスタチンMを生じない細胞のcDNAと交差ハイブリッド形成しない配列はアフリカツメガエル(Xenopus)卵母細胞の使用によりスクリーニングすることができる。原核発現ベクター例えばpET-11中へ

する。これらの複製系はトランスフェクションの選択を可能にし、並びに遺伝子を挿入できる便宜な制限部位を有する遺伝子を与えるために開発された。

遺伝子を、天然存在野生型転写および翻訳調節領域を認識しない宿主中へ発現させる場合にはさらに操作が必要である。便宜には、種々の3'-転写調節領域が知られ、終結コドンの下流に導入することができる。構造遺伝子の5'の上流の非コード領域5'-領域はエンドヌクレアーゼ制限、BamHI切除などにより除去することができる。あるいは、便宜な制限部位が構造遺伝子の5'-末端近くに存在する場合に構造遺伝子を制限し、構造遺伝子をプロモーター領域に連結するアダプターを用いることができ、その場合にアダプターが構造遺伝子の喪失スクレオチドを与える。

種々の方法を、転写の5'-3'-方向に転写調節領域および翻訳開始領域(それはまた調節の誘発を可能にする調節配列を含むことができる)、開始領域の転写および翻訳制御下の構造遺伝子



特開昭64-63385(日)

並びに転写および翻訳終結領域を有する発現カセットを与えるために用いることができる。発現カセットはさらに発現生成物の安定化を与えるバクテリオファージまたは細菌遺伝子の少くとも1つのリーダー配列、および発現生成物の分岐を与える分岐リーダー配列、並びに標的遺伝子を含むことができる。

適当な調節配列の選択には発現に作用する次の因子が考慮される。転写調節に関しては、メッセージRNAの量および安定性が遺伝子生成物の発現に影響を与える重要な因子である。mRNAの量は特定遺伝子の複製数、そのプロモーターの相対的効率およびプロモーターを調節する因子例えばエンハンサーまたはレプレッサーにより決定される。mRNAの安定性はmRNAのリボヌクレアーゼ酵素に対する感受性により支配される。一般に、エキソヌクレアーゼ消化はmRNAの端部における構造モチーフの存在、パリンδροーム構造、修飾されたヌクレオチドまたは特定ヌクレオチド配列により阻害される。エンドヌクレアー

ゼ消化はmRNA内の特定認識部位で生ずると思われ、安定なmRNAはこれらの部位を欠くであろう。また高水準の翻訳をするmRNAはまたmRNA上のリボソームの存在により消化から保護される若干の証拠がある。

翻訳調節に関して、mRNA上の存在を考えると、発現は開始(mRNAに対するリボソームの結合)の速度、延長(mRNAを横切るリボソームのトランスロケーション)の速度、翻訳後修飾の速度および遺伝子生成物の安定性に影響を及ぼすことにより調節される。延長の速度はおそらく微量mRNAに対するコドンの使用が翻訳速度を低下できる点でコドンの使用により影響される。開始はコーディング配列の開始のすぐ上流の領域中で起ると思われる。原核生物において、多くの場合にこの領域はシャイン・ダルガルド配列と呼ばれるAAGの共通ヌクレオチド配列を含む。この配列がリボソーム結合部位を確立するけれども、上流および下流両方の配列が十分な開始に影響をみえることができることが明らかである。真

核生物において、発現を調節する翻訳エンハンサー配列が検出された。

延長はまた、おそらくリボソームが開始部位を認識する構造モチーフの形成によりリボソーム結合に影響できるコーディング領域内のヌクレオチド配列の存在を示す。開始ATGコドンに関するAAGの配列の位置が発現に影響を与えることができる。従って、個々の発現速度を決定するのはこれらの因子のすべての相互作用である。高発現遺伝子はこれら因子のすべての組合せを生じて特定発現速度を生じた。高水準の遺伝子生成物を生ずる発現系の設計は発現に影響を与えることが決定された特定領域だけでなく、またこれらの領域(従ってそれらの配列)が互いに如何に影響を与えるかを考慮すべきである。例示転写調節領域またはプロモーターには、細菌に対してβ-galプロモーター、λ左および右プロモーター、lprおよびlacプロモーター、lpr-β-gal融合プロモーターなど、酵母に対して糖分解酵素プロモーター例えばADH-1および-2プロモーター、

GPKプロモーター並びにPGIプロモーター、TRPプロモーターなど、哺乳類細胞に対してSV40初期および晚期プロモーター、アデノウイルス主晚期プロモーターなどが含まれる。

転写調節領域はさらに、例えば増殖増進中の発癌剤または発現生成物の存在または不在、温度などにより構造遺伝子の発現を制御できる調節配列を含むことができる。例えば、原核細胞における構造遺伝子の発現はバクテリオファージM13、プロモーター並びにバクテリオファージM13オペレーターおよびCI857温度感受性レプレッサーを含む調節配列を用いて温度により調節することができる。プロモーターの調節はレプレッサーとオペレーターとの間の相互作用により達成される。

真核細胞において、調節配列は例えば、プロモーター配列例えばSV40プロモーターに融合してキメラプロモーターを形成でき、あるいは発現カセットのどこかに好ましくはプロモーター配列に接近して挿入できるサイトメガロウイルスエンハ

特開昭64-63385 (10)

ンサー配列を含むことができる。構造遺伝子の発現はまた、例えば構造遺伝子に対し優性増殖性遺伝子領域5'または3'に対する遺伝子を隣に連附し、宿主細胞を選択条件下に増殖させることにより増殖させることができる。増殖性遺伝子の例はジヒドロ葉酸レダクターゼ (dhfr) に対する遺伝子であり、その発現を細胞中に増加させメトトレキサート (mtx)、細胞拮抗剤、に対する耐性を与えることができる。

Lacオペレーター-プロモーター、lac プロモーターまたはMP、プロモーター-0、プロモーター、および温度感受性レプレッサーを、特に $\lambda$ -Cro、 $\lambda$ asまたはN遺伝子リボソーム結合部位とともに用いるオンコスタチンMを発現できる発現カセットが特に重要である。構造遺伝子はリボソーム結合部位の下流に結合され、転写調節領域および翻訳調節領域の調節制御下にある。

免疫生成物の安定性は、例えばバクテリオファージMN遺伝子またはCro遺伝子、あるいは細菌アルカリ性ホスファターゼ遺伝子のN末端アミノ

酸を含む融合タンパク質の合成を与えることにより達成することができる。リーダー配列は構造遺伝子の upstream にそれとともに読み枠中に与えられる。関心のリーダー配列は原核生物遺伝子例えばバクテリオファージMN遺伝子またはCro遺伝子、あるいは細菌アルカリ性ホスファターゼ遺伝子の約8〜約85、好ましくは約15〜約25個のN末端アミノ酸を含む。

さらに、融合遺伝子は分画リーダーおよびプロセッシングシグナルをエンコードする構造遺伝子に対する5'配列を与えることにより取除くことができる。例示分画リーダーにはベニシリナーゼ、 $\alpha$ 因子、免疫グロブリン、T細胞受容体、外膜タンパク質、血清アルブミン、インスリン、消化酵素、 $\beta$ -形質転換成長因子などの分画リーダーが含まれる。構造遺伝子との分画リーダーの適当な読み枠中の融合により成熟オンコスタチンMまたは類似体を増殖中へ分画させることができる。

少くとも1個の追加アミノ酸を構造遺伝子とリーダー配列との間に挿入することができ、介在ア

ミノ酸(類)は、例えば融合タンパク質の切断に対する酵素または化学切断部位を与える。あるいは、リーダー配列および構造遺伝子生成物を含む融合タンパク質は成熟ポリペプチドの初期なく使用を見出すことができる。

発現カセットは適当な細胞宿主中のエキソソーム維持のために複製系内に含まれることができ、または宿主ゲノム中へ組込まれることができる場合に複製系なしで与えることができる。DNAは公知の方法、例えば形質転換、リン酸カルシウム法、陽イオンDNAの使用、エレクトロポレーション

(electroporation)、細胞とウイルスとの接触によるトランスフェクション、細胞中へのDNAのマイクロ注入などにより宿主中へ導入することができる。

構造遺伝子が適当な宿主中へ導入されると、宿主は増殖して構造遺伝子を発現することができる。宿主細胞は適当な培養中で両側面に増殖させることができる。プロモーターが阻害性である場合、例えば原核系においては、許容条件例えば温度変

化、代謝生成物または栄養素の消耗または過剰などが使用される。哺乳類系において、増殖遺伝子が構造遺伝子と隣接して使用される場合に増殖に対する適当な方法が使用される。

分画が与えられる場合に、融合または非融合免疫生成物を増殖細胞から常法により分離することができる。分画が与えられない場合に、宿主細胞を回収して普通の方法により溶解することができる。次いで所望生成物が公知技術例えばクロマトグラフィー、電気泳動、免疫抽出などにより分離し、精製される。

組換え生成物はグリコシル化または非グリコシル化であり、野生型または他のグリコシル化を有することができる。一般に、グリコシル化は多くても約50%、通常多くて約20%、野生型グリコシル化とは異なる。グリコシル化の量は一部は個々のペプチドの配列、並びにそれが生成される生物体による。例えば大腸菌 (*E. coli*) 細胞中の生成物の発現は非グリコシル化生成物を生じ、昆虫細胞中の生成物の発現は哺乳類細胞中の生成物

## 特開昭64-83395 (11)

の発現より低いグリコシル化を生ずる。

オンコスタチンMおよび他の主題化合物の使用

主題化合物は種々の方法で生体内および試験管内の両方に使用できる。主題化合物は主題化合物に対する抗体の製造に使用でき、それは生体内または試験管内の使用を見出すことができる。抗体は通常で、主題ポリペプチドを抗原として用い、ポリペプチドを哺乳動物主例えばマウス、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギなどに、強にアジュバント例えば完全フロイドアジュバント、水酸化アルミニウムゲルなどとともに注入することにより製造することができる。次いで宿主から採血し、血液を多クローン性抗体の分離に用い、あるいはマウスの場合に末梢血液リンパ球または脾臓リンパ球（B細胞）を適切な骨髄細胞と融合させて主題化合物に対し特異性の抗体の単クローン性発現のための細胞株を不死化するために用いることができる。

多クローン性または単クローン性抗体を調製することができる。次いでそれを試料例えば細胞また

は細胞したプローブを細胞性mRNAに対しハイブリッド形成させて二本鎖複合体を形成させることができ、それを洗脱により検出することができる。若干の目的のためにオンコスタチンM mRNAの量を定量的であることを望むことができる。これは一本鎖オンコスタチンM mRNAの既知量を含む標準試料中で検出された標識の量を試験試料中で検出された標識の量と比較することにより行なうことができる。

主題化合物は主題化合物に対する受容体の存在を検出する配位子として用いることができる。この方法で、主題化合物に対する受容体の存在および密度、そのような受容体の存在に対する種々の化合物の効果のモニター並びに主題化合物の効果に対する所与細胞の感受性の決定により細胞を識別することができる。さらに、オンコスタチンM様生物活性を有すると思われるペプチドを、そのオンコスタチンM受容体に結合する能力と天然存在オンコスタチンMのそれとを比較することにより評価することができる。一般に、試験ペプチド

は生組織例えば血液中の主題ポリペプチドの存在の診断または検出に用いることができる。体液中の主題ポリペプチドの検出はまた腫瘍細胞の存在の指標として用いることができる。抗体はまた主題ポリペプチドの精製および天然または合成源からそれを分離するアフィニティークロマトグラフィーに用いることができる。抗体はまた培養または生体中の細胞に結合する主題ポリペプチドの量の制御における使用を見出すことができ、それにより細胞の増殖を調節することができる。

オンコスタチンM mRNAに相補性の配列を含むプローブもまた調製し、診断助剤として用いることができ、例えば細胞中のオンコスタチンM mRNAの存在および（または）量を腫瘍細胞の存在の検出に用いることができる。ハイブリッド形成配列を含むと思われる細胞、組織試料または体液を含む試験試料を処理して細胞を溶解させ、次いで酸性剤例えばグアニジン塩酸塩で処理して一本鎖mRNAを遊離させることができる。次いで、例えばPAまたはビオチン化ヌクレオチドで

は、試験ペプチド並びに標識オンコスタチンMまたは、オンコスタチンM受容体に高親和性で結合する他のペプチドを、オンコスタチンM受容体を含む調製物とともにインキュベートして標識オンコスタチンMの結合の阻止の量を観察することにより、実験セクションに阻害のように評価することができる。受容体に結合する試験ペプチドがオンコスタチンM作用物質であるか拮抗物質であるかの評価は、次にオンコスタチンMに関連する生物学的機能に対するそれらの効果、例えば腫瘍細胞の増殖の阻止を、実験セクションに記載されるように、観察することにより決定することができる。

主題化合物は、感受性でない細胞と識別されるので、試験管内培養に用いて主題ポリペプチドに感受性の細胞または細胞系の増殖を阻止することができる。従って、不均一細胞混合物または細胞系は、望ましくない細胞が主題ポリペプチドに対し感受性である場合に望ましくない細胞を除去することができる。

## 特開昭84-83395 (12)

主題組成物は、広範囲の器官例えば血液、肺臓、乳器官、副立腺、腸、肝臓、心臓、皮膚、腺臓、脳などを胃することができ広範囲の腫瘍状態例えば癌腫、肉腫、風色腫、リンパ腫、白血病の治療に用いることができる。

主題ポリペプチドは、腫瘍状態の場合に生体内に、例えば血液内、腺臓、皮下などに注入により投与することができる。主題化合物は試験管内に用いて自己骨髄移植のための骨髄からの腫瘍細胞を除去し、あるいは再注入の前に他の組成物例えば血液中の悪性細胞の増殖を阻止または除去することができる。

主題組成物はまた造血系の障害の治療として、特に骨髄機能が抑制された患者例えば無形成貧血、遺伝性または後天性免疫不全、を患う患者、あるいは放射線療法または化学療法を受ける患者中の造血を刺激する手段として用いることができる。

本発明の組成物は実質的にすべての皮膚の創傷、肉腫創傷、および身体の上皮ライニング中重要器官の傷害を含む広範囲の創傷の治療に用いることが

できる。治療に適する創傷には外傷例えば熱傷、創傷、切傷などに起因する、並びに外科操作例えば外科切開および皮膚移植に起因するものが含まれる。本発明の組成物による治療に適する他の状態には慢性状態例えば慢性潰瘍、糖尿病潰瘍および他の非治癒（栄養）状態が含まれる。

オンコスタチンMは、目された領域に適用するために生理学的に許容される媒体中に混合することができる。媒体の性質は広く変動することができる。意図適用位置による。皮膚に対する適用にはクリームまたは軟膏剤が通常好ましく、適当な薬剤にはラノリン、シルバデン (Silvadene) (マリオン (Marion) 製) (特に熱傷の治療に対し)、アクアフォル (Aquaphor) (デューク・ラボラトリーズ (Duke Laboratories, South Norwalk, Connecticut) 製) などが含まれる。望むならば、オンコスタチンM含有組成物を包帯およびペプチドに対する創傷の連続治療のための他の創傷包帯剤中に組合せることができる。エアロゾル適用もまた使用を見出すことができる。

治療組成物中のポリペプチドの濃度は臨界的ではない。ポリペプチドは上皮細胞増殖誘発量で存在する。組成物は腫瘍領域に局所的に、典型的には眼に対する点眼液としてあるいは皮膚に対するクリーム、軟膏またはローションとして、適用される。眼の場合に、局所的な治療が望ましく、通常4時間またはそれ未満の間隔で適用される。皮膚に対しては治療中、1日2〜4回またはそれ以上頻りに治療組成物を適用して治療組成物を腫瘍領域上に連続的に維持することが望ましい。

オンコスタチンMは他の成長調節タンパク質、特に白血球により生産されるもの、より特定のには成長調節タンパク質と実質的に相同性を有する因子と一時的に使用を見出す。好ましくは相同性は少なくとも約70%以上、好ましくは少なくとも約90%以上のインターフェロン、形質転換性成長因子、より特定のには形質転換性成長因子- $\beta$ 、それらの1種または2種、あるいはそれらの活性フラグメントおよび腫瘍壊死因子である。

治療における使用には、腫瘍組成物の種々の

成分は脊椎動物源から誘導することができ、必ずしも細胞と同一源である必要はない。しかし、哺乳類の治療には、免疫源応答に対する可能性を減少するように通常天然存在成分と実質的に同一または同一の配列を有する成分を用いることが望ましい。通常、成分は宿主の天然存在配列のアミノ酸配列とは5モル%未満、より普通には2モル%未満異なる。

組成物は抗腫瘍活性を指向する2種またはそれ以上の成分を有することができる。通常6種未満の成分を有する。阻止成分の約10%通常少くとも25重量%から多くても約90%、通常多くても80重量%存在するオンコスタチンMのほかは、1種またはそれ以上の形質転換性成長因子を用いることができ、並びに1種またはそれ以上のIFNまたは腫瘍壊死因子を用いることができる。従って、個々の領域において、個々の化合物よりむしろ関連組成物の混合物の使用を望むことができる。図に示したように、天然存在化合物のほかに活性フラグメントを、並びに1関連分子の部分が他の

## 特開昭64-83395 (18)

関連分子の他の部分に結合しているモノを用いることができる。例えばEPA 32,134号および相当する米国特許出願第791,247号(1985年10月25日提出)参照。

他の成長刺激化合物は種々の方法で得ることができる。それらは市販品から購入することができる。あるいはそれらを天然存在型、特に調整増進から入手でき、その場合に個々の成分を種々の精製法を用いて精製することができる。これらの方法は溶媒抽出、ゲル浸透クロマトグラフィー、逆相HPLC、電気泳動などを含むことができる。小分子には種々の合成法を用いることができ、その場合にポリペプチドは固相担体上で合成されよう、多くの市販合成装置を利用でき、例えばスミスライン(Smithkline)、ベックマン(Beckman)、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)ほかから有利に使用できる。

組換え方法もまた用いることができ、その場合に個々の成分またはその活性フラグメントをコードする配列を発現カセット(expression cassette)

中へ導入することができ、次いでそれを適宜な宿主中へ形質転換することができる。宿主または菌株両宿主を用いることができる。配列を分離または調製し、発現カセットを精製し、発現カセットを染色体外要素上に維持するかまたは宿主の染色体中へ組込むことができる宿主中へ発現カセットを形質転換し、ポリペプチド生成物を発現し分離する種々の技術は文献中に多数の例示が見出され、本明細書に詳記する必要がない。例えば米国特許第4,530,801号;第4,551,423号;第4,568,790号;第4,582,800号および第4,615,974号参照。

組成物はその意図目的、成分の所望割合並びに成分およびそれらの活性の性質により広く変動する。従って、細胞系の性質、異なる成分に対するその応答およびそれらの相乗活性により種々の成分の割合が変動する。通常、組合せに用いるオンコスタチンMまたは類似体の量は、単独で所望活性を与えるオンコスタチンの量の約0.1%以上で、約50%未満であろう。多くは、オンコスタチンMまたは類似体の量は単独で使用されるオンコ

スタチンMまたは類似体の量の約0.5~2.5%の範囲内にある。形質転換性成長因子または腫瘍増進因子の含量は一般に、所望活性を達成するために単独で使用される形質転換性成長因子または腫瘍増進因子の量の約0.1~50%の範囲内にある。IFNに対しては腫瘍活性に対する直接的対照がない。従ってIFNの量はオンコスタチンMの予定量とともに所望水準の抗腫瘍阻止を与えるIFNの濃度を筋にする。

培養に使用できるオンコスタチンMまたは類似体の濃度は一般に約1~500増殖阻止単位/0.8の範囲内であろう(単位の規定には実験セクション参照)。使用される形質転換性成長因子または腫瘍増進因子の濃度は一般に、約1~25増殖阻止単位/0.8である(単位の規定には実験セクション参照)が、インターフェロンの濃度は一般に約1~50増殖阻止単位/0.4の範囲内にある(単位の規定に対する実験セクション参照)。従って、培養において、培養中の種々の型の細胞を有する種々の成分の異なる組合せを用い、異なる

組成物に対する培養中の細胞の応答を測定することにより培養中に種々の程度の阻止を与えることができる。この方法で、腫瘍増進の治療において哺乳類宿主で使用できる種々の組合せを予測することができる。

生体内使用に対し主題組成物を種々の方法で、経時により、注入により、局所的、経口的などで投与することができる。投与は任意の生体的に許容される媒体、例えば無菌水、リン酸緩衝食塩水、食塩水、水溶性エタノールなど、中であることができる。

主題組成物は、特にリボソームが個々の腫瘍細胞を抑制する本質分子例えば抗体、非分解性粒状マトリックスなどに結合できる場合にリボソームの内腔中を含め種々の方法で配合することができる。他の成分例えば緩衝液、安定剤、昇昇剤、殺菌剤などを配合物中に含めることができる。これらの成分は文献中に広範な例示が見出され、本明細書に特に記載する必要がない。

実験

**内容目次**

**実施例 1 : オンコスタチンM、TGF- $\beta$ 、  
TNFおよびINF- $\gamma$ の生物活性  
の測定法**

- A. 増殖阻止決定
- B. 細胞増殖修飾決定
- C. 軟着床コロニー阻止決定
- D. ノードマウス中の腫瘍の増殖の阻止
- B. 受容体結合決定

**実施例 2 : 培養細胞からのオンコスタチンM、  
TGF- $\beta$ 1およびINF- $\gamma$ の分離  
および精製**

- A. Tリンパ球の初代培養液からのオンコスタチンM、TGF- $\beta$ 1およびINF- $\gamma$ の分離
- B. U937細胞からのオンコスタチンMの分離

**実施例 3 : 精製オンコスタチンMの物理化学的性質**

- A. オンコスタチンMの特性決定

TGF- $\beta$ 1およびINF- $\gamma$ の効果

- B. A375細胞およびMCF-7細胞に対するオンコスタチンMおよびTNF- $\alpha$ の効果

**実施例 4 : オンコスタチンMのDNAクローニング  
およびDNA配列**

- A. cDNAライブラリーの調製
- B. cDNAクローニングの制限部位地図作成
- C. オンコスタチンMをエンコードする2.1kb cDNAクローニングの配列
- D. 種々の細胞型中のmRNA (+) RNA

**実施例 5 : 組換え細胞中に発現されたオンコスタチンM**

- A. 発現プラスミドの調製およびクローニング
- B. 組換えオンコスタチンM遺伝子の調製
- C. 組換えタンパク質の調製

**実施例 6 : 哺乳類細胞中に発現されたオンコスタチンM**

- A. 発現プラスミドの調製およびクローニング
- B. 組換えオンコスタチンM遺伝子の調製

**特開昭64-63395 (14)**

B. ヒトTリンパ球からのオンコスタチンMの特性決定

**実施例 4 : 精製オンコスタチンMの生物活性**

- A. 腫瘍細胞増殖の阻止
- B. 腫瘍細胞コロニー形成の阻止
- C. 正常および形質転換細胞に対するオンコスタチンMの差別的効果
- D. オンコスタチンMにより誘発された形態変化
- E. ノードマウスにおけるA375細胞の増殖の阻止
- F. 受容体結合活性

**実施例 5 : オンコスタチンMに対する抗体の特異性**

- A. ペプチド合成
- B. 抗体の生成
- C. オンコスタチンMのロウ糖化

**実施例 6 : オンコスタチンMと他の成長因子との相乗効果**

- A. A375細胞に対するオンコスタチンM、

C. 組換えオンコスタチンMの調製

**実施例 10 : 昆虫細胞中に発現されたオンコスタチンM**

**実施例 11 : 組換えオンコスタチンMの生物活性**

**実施例 12 : 組換えオンコスタチンMの物理化学的性質**

- A. SDS-PAGE

**実施例 1**

オンコスタチンM、TGF- $\beta$ 1、TNFおよびINF- $\gamma$ の生物活性の測定法

**A. 増殖阻止決定**

A375黒色腫瘍細胞 ( $4 \times 10^3$  細胞/50  $\mu$ l)、Mv1L9マウス胎上皮細胞 ( $2.5 \times 10^3$  細胞/50  $\mu$ l) または適当な細胞密度における関心の他の細胞系を平底96ウェル組織培養プレート (コスター (Costar 3596, Cambridge, MA)) 上で10%熱失活ウシ胎仔血清およびP/Sを補足したダルベッコ (Dulbecco) の改良イーグル培養液 (DMEM) を含む増殖培養液中で4時間絶代培養した。増殖阻止について検定する試験試料を各

## 特開昭64-63395 (15)

ウェルに加えた試験試料 50  $\mu$ l で三重に検定した。細胞を 97℃ で 72 時間インキュベートした。このインキュベーション時間の終りに各ウェルを、5 - (<sup>125</sup>I) ヨードデオキシウリジン (0.05  $\mu$  Ci/ウェル) (7 マーシム (Aeroban, Arlington Heights, IL) 製) を含む増殖培地 100  $\mu$ l で 84 時間処理した。単層モノ細胞培養液を PBS で洗浄し、95%メタノール中で固定し、風乾した。細胞に取込まれた (<sup>125</sup>I) ヨードデオキシウリジンを 1N 水酸化ナトリウム 200  $\mu$ l で可溶化し、細胞増殖の量を能動的に増殖する細胞の DNA 中に取込まれた (<sup>125</sup>I) ヨードデオキシウリジンの量により測定した。倍増の 1 単位は、非増殖細胞と比較して A575 細胞の増殖の 90% 阻止を与えるのに要した試験試料の量と規定した。

細胞分裂阻止もまた非増殖細胞を系列希釈の試験試料とともに増殖培地中でインキュベートすることにより評価した。48 時間後、細胞をトリプシン処理し、生存および死亡細胞の全数を

0.2%トリパンブルーで染色することにより測定した。同様に生存細胞の数の減少と生存細胞の DNA 中に取込まれた放射能の量の減少との間の相関を計算した。

B. DNA 中の <sup>31</sup>P-チミジン取込みを用いる細胞増殖能の検定 (GIA)

検定は 86 平底ウェルプレート (コスター (Costar) 9598) 中で行なった。ヒト胚性細胞系 (A575) ( $3 \times 10^4$  / 100  $\mu$ l) または関心の他の細胞系の細胞を適当な細胞密度で用いた。100  $\mu$ l 増殖培地中の細胞を各ウェル中に入れた。3 時間後に増殖培地中の試験試料 100  $\mu$ l を各ウェルに加えた。プレートを 97℃ で 9 時間インキュベートした。次いで <sup>3</sup>H-チミジン (比活性 27  $\mu$  Ci/ $\mu$ g) の溶液 55  $\mu$ l (0.5  $\mu$  Ci) を各ウェルに、インキュベーションの最後の 8 時間加えた。次いで細胞をマルチウェルハーベスター (PHDセル・ハーベスター (PHD Cell Harvester)、ケンブリッジ・テクノロジー社 (Cambridge Technology, Inc.) 製) を用

いてガラスフィルターストリップに移した。フィルターをシンチレーションバイアルに移した。シンチレーション液 (サイエントیفिकास (Scientific) Veras) II、フィッシャー・サイエントフィック社 (Fisher Scientific Co.) 製) 2 ml を加え、試料をシンチレーションカウンター中で計数して <sup>3</sup>H-チミジン取込みを定量化した。

## C. 数個のコロニー阻止検定 (TCI)

増殖培地中の 0.5% 遮天 (アガーノープル (Agar Noble)・ディファコ・ラボラトリーズ (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) 製) の 0.5 ml 遮天層を 34 ウェルコスター組織培養プレートに加えた。1 ~  $2.5 \times 10^4$  A575 細胞または適当な細胞密度における関心の他の細胞系および種々の濃度の試験される因子を含む増殖培地中の 0.3% 遮天 4 ml を遮天遮光層上に置いた。プレートを空気中 5% CO<sub>2</sub> の増殖雰囲気中で 97℃ でインキュベートし、7 日後、図に用いたと同程度の試験される因子を含む増殖培地中の 0.3% 遮天 0.5 ml の添加により再フィードした。

コロニーは数えられ、いずれ、非汚染であった。6 細胞以上を有するコロニーの数を記録した。

## D. スードマウス中の腫瘍の増殖の阻止

A575 腫瘍細胞 ( $2.5 \times 10^4$ ) または関心の他の細胞系の適当な数の細胞をスードマウスの肩甲骨間領域中に皮下注射した。腫瘍が触知可能になったときに、マウスの半数に 0.15  $\mu$ g ウレタンアルブミン (BSA) を含む PBS 100  $\mu$ l または 0.15  $\mu$ g BSA と試験試料を含む PBS 100  $\mu$ l を腫瘍の近位に皮下接種した。マウスを第 1 接種の約 19 日後まで 2 ~ 3 日毎に同じ方法で接種した。各腫瘍の直径および重さをカリパスを用いて測定した。

## E. 放射感受性検定

オンコスタチン M を TPA 処理 U837 細胞から均質性に精製し (実施例 2B 参照)、ヨードゲン法 (ピアス・ケミカル社 (Pierce Chemical Co.)) により (<sup>125</sup>I) で放射性標識した。ヨウ素化タンパク質は増殖阻止検定により測定してその初めの生物活性の約 85% を保持した。

特開昭64-63398 (18)

関心の細胞系を48ウェルプレート中に $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルの密度に塗布し、検定の開始前に37℃で18~24時間維持した。次いで細胞単層を結合緩衝液 (Binding buffer) [リンスレイ (Linsley) ほか、バイオケミストリー (Biochemistry) (1986) 25: 2978~2986] で1回洗浄した。全結合を測定するために $^{125}$ I-オンコスタチンMを0.5~100 ng / ml の範囲の濃度で加えた。非特異性結合を測定するために非標識オンコスタチンMを $^{125}$ I-オンコスタチンMと同時に $^{125}$ I-オンコスタチンMの濃度の20~100倍高い濃度で重複プレートに加えた。結合を23℃で2~5時間進行させ、次いで単層を結合緩衝液で4回洗浄し、細胞に結合した放射能を1N-NaOHで可溶化し、ガンマカウンター中で計数した。特異的結合は全結合から非特異的結合を差引くことにより計算した。解離定数 (Kd) および結合容量をスキャッチャー分析 [スキャッチャー (Scatchard)、ブナールス・オブ・ザ・ニューヨーク・アカデミー・オブ

サイエンス (Ann. N. Y. Acad. Sci.) (1949) 51: 880] により決定した。

#### 実施例2

培養細胞からのオンコスタチンM、TGF- $\beta$ 1 およびIFN- $\gamma$ の分離および精製

A. Tリンパ芽球の初代培養株からのオンコスタチンM、TGF- $\beta$ 1 およびIFN- $\gamma$ の分離

#### III 細胞培養

単核細胞を含むロイコフラクションを正常成人ボランティアの血液のパフィーコート (ピュージェット・サウンド・ブラッド・センター (Puget Sound Blood Center, Seattle, WA)) から分離した。単核細胞をフィコール・ハイバックで等密度遠心法により分離した。界面細胞を摘出し、血小板を1 mM  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  の存在下にトロンビン (0.5 U / ml) で除去した。単核およびB細胞を除去するためにプラスチック表面またはナイロンウールに付着した細胞を除去した。生じた末梢血単核リンパ球 (PBMC) はT細胞94%、B細胞

0.5%未満および単核5%から構成された。初代Tリンパ芽球を、ワイトヘマグルチニン (PHA) (2  $\mu$ g / ml) およびT細胞特異性単クローン性抗体MAb 9.3 (レドベター (Ledbetter) ほか、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.) (1985) 135: 2331~2338) で3日目毎に再刺激することにより4週まで培養中に維持できる。培養期間の終りに95%以上の細胞がなお生存する。Tリンパ球培養のこの方法は単核/マクロファージを實質的に含まない細胞集団を生じ、99%はT細胞由来培養細胞を与える。

前記のように得られたPBLをウシ血清アルブミン-リノレン脂助融結合体 (200  $\mu$ g / ml) を補足した合成培養中でPHA (2  $\mu$ g / ml) で96時間活性化した。この上澄み液体の収集物は遠心した。一次遠心後、非付着リンパ芽球を、ウシ血清アルブミン-リノレン脂助融結合体を含む合成培養液中で $1 \times 10^6$  / ml に調整し、PHA (0.5  $\mu$ g / ml) および単クローン性MAb 9.3 (1  $\mu$ g / ml) で、37℃、5%

CO<sub>2</sub>で72時間再刺激した。72時間培養後4週間たった。血清を含まない調整培地を抽出し、遠心分離により清澄化し、限外濾過 (アミコン・ダイアフロ (Amicon Diaflo) 膜YM-10、10,000分子量カットオフ; アミコン社 (Amicon Corp., Danvers, MA) 製) により濃縮した。活性化した濾液PBL上澄みはTGF- $\beta$ 1、 $\gamma$ -IFN およびオンコスタチンMの精製に対する出発物質であった。

#### 両相相HPLCによる精製

活性化PBLの濃縮上澄みを0.1 M酢酸に対して透析し、凍結乾燥し、0.1 M酢酸中に再構成し、バイオゲル (Bio-Gel) P-60 (2.5 x 88 cm、バイオファーマ・ラボラトリーズ (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) 製) 上のゲル透過クロマトグラフィーにかけ、20 ml / 時の1 M酢酸と平衡させた。主培養阻止成分を含む画分をブールした。汚染タンパク質の大部分はカラムの排除容積中に抽出し、A375培養阻止成分から分離された。A375細胞に対する抗培養阻止の生



## 特開昭64-63295 (17)

ピークはMr 14,000~28,000の分子重量範囲内で認められた。超範囲阻留性を有する画分をブールし、凍結乾燥した。

P-80ブールを水中の0.05% TFA中に再溶解した。さらに「CF-B」、r-IPNおよびオンコスタチンMの精製が逆相HPLCにより達成された。分離は調製用μボンダパック(Bondapak) C<sub>18</sub>カラム(10μmの粒径、7.8×300mm;ウォーターズ(Waters, Milford, MA)製)で室温で行なった。一次移動相は0.05%水性トリフルオロ酢酸であり、二次移動相はアセトニトリル含有0.045%トリフルオロ酢酸であった。アセトニトリルの濃度はタンパク質の溶出のために室温で2.0 ml/分の流量で240分間直線的に(0.083%毎分)増加させた。

活性の3ピークが相互によく分割されることが認められた。初期活性の峰は33%が回収された。GIF-1は33%アセトニトリルで溶出し、回収活性の10%を含む; GIF-2は38%アセトニトリルで溶出し、回収活性の13%に相当し;

オンコスタチンM含有画分は再び分析用μボンダパックC<sub>18</sub>カラム、次に分析用C<sub>18</sub>ビグックカラム上で、溶出に対し1-アロパノール含有0.033%トリフルオロ酢酸でクロマトグラフを行なった。勾配条件および流量はr-IPNの精製に対して記載したと同様であった。精製オンコスタチンMはドデシル硫酸ナトリウムおよびアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、A375細胞およびMv1Lu細胞に対する増殖阻留性について決定した。相乗試験に用いたオンコスタチンMは約80%純度であった。オンコスタチンMのこの調製物の用量応答および相乗性は、マクロファージ樹状細胞の調整増地から分離し、逆相HPLCにより精製した均質オンコスタチンM(ザリング(Zarling)ほか、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA (1988) 85: 9739~9743)に一致した。

B. U937細胞からのオンコスタチンMの分離の細胞培養

GIF-3は40~42%アセトニトリル間に溶出し、全回収活性の約77%を含むした。主活性ピークを、示したようにブールし、次に特性決定した。

## 3. 逆相HPLCによる一画の精製

「CF-B」含有画分を再び分析用μボンダパックC<sub>18</sub>カラム(3.9×300mm)上で0.033%トリフルオロ酢酸を移動相調節剤として含む1-アロパノールでクロマトグラフを行なった。1-アロパノールの濃度は0.2 ml/分の流量で6時間の間直線的に(0.028%毎分)増加させた。

r-IPN含有画分を再び分析用μボンダパックC<sub>18</sub>カラム、次に分析用C<sub>18</sub>ビグック(Vydac)カラム(3.9×300mm粒径、ザ・セパレーションズ・グループ(The Separations Group, Hesperia, CA)製)上で1-アロパノール含有0.033%トリフルオロ酢酸を溶出に用いてクロマトグラフを行なった。1-アロパノールの濃度はタンパク質の溶出のために室温で0.2 ml/分の流量で360分の間直線的に(0.028%毎分)増加させた。

U937細胞、樹状細胞リンパ細胞系系(サンドストロムほか(Sundstrom and Nilsson)、インタナショナル・ジャーナル・オブ・カンサー(Int. J. Cancer)、(1978) 17: 865~877)を850 cm<sup>2</sup>回転瓶(コーニング(Corning)C2540)中で10%ウシ胎仔血清(FCS)、ペグシリン/ストレプトマイシン(PS)、L-グルタミンおよび100 ng/ml 2-mercaptoethanolを満足した全量300 mlのRPMI 1640培地中で4×10<sup>6</sup>細胞/mlの濃度で培養した。4日後にFCSおよびTPAを含む上澄みを除き、同転瓶を血清不含RPMI-1640で5回洗浄し、分離した細胞(1×10<sup>6</sup>細胞/ml)を血清不含培地で3回洗浄して瓶に戻し、同転瓶当り血清不含RPMI-1640培地125 mlの滅菌容積にした。1日後に上澄みを除き、遠心分離して細胞を除き、0.45 μm(μ)カルゲン(Palagon)フィルターを通して濾過し、中空糸系(マコン・カートリッジ(Aicon cartridge))

## 特開昭64-53395 (18)

HIP10-201を用いて濃縮して150 mlの容量にした(初期容積1500 ml)。オノコスチンMはまた150 ml組織培養フラスコ中の血清不含TPA処理U937の上澄みから分離した。上澄みをアミコン・ダイアフロ(Amicon Diaflo)膜PM-10、10 kDカットオフ、濃縮し、透析した。透析後、濃縮物を酢酸で希釈して500 ml中の0.1 N酢酸の最終濃度になり、アミコン(Amicon) PM-10フィルターを用いて50 mlに濃縮した。50 ml濃縮物を0.1 N酢酸で400 mlに希釈し、同一フィルターで40 mlに濃縮した。濃縮物を1 N酢酸で希釈し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。生じた濃縮物を凍結して凍結乾燥した。凍結乾燥物質を精製段階に用いた。

## ゲル浸透クロマトグラフィーによる精製

バイオール(Bio-Biol) TSK-250カラム(800 × 3.15 mm)(バイオラド(Bio Rad)製)を高速度液体クロマトグラフ系に取付けた。組成分(100 mg/ml)を0.1 M水性トリフルオロ

メタニックに注入した。流量は2.0 ml/分に設定し、チャート速度は0.25 cm/分であった。一次溶媒0.1% TFAと二次溶媒アセトニトリル-TFA 0.1%との間に直線勾配を用いた。勾配条件は0~30%、20分;次に30~45%、150分;45~55%、20分;および55~100%、10分であった。溶媒はすべてHPLC用であった。4 ml面分を調製し、各面分の一定部分を増殖阻止活性について検定した。面分78~79が活性の大部分を含むことが認められた。活性面分は41~52%のアセトニトリル濃度の間に溶出した。

面分78~79をアールした。0.1% TFA 18 mlをアール面分に加えた。混合物を室温でμボンドバク-C18カラム(3.9 × 300 mm)(C18<sup>+</sup>として示す)中へ注入した。流量は1 ml/分に設定し、チャート速度は0.25 cm/分であった。勾配条件は0~35%、10分;35~45%、100分;および45~100%、10分であった。面分を調製し、一定部分をとり

酢酸(0.1% TFA)中の40%アセトニトリルに溶解した。混合物の8 ml部分を注入し、増殖を0.1% TFA中の40%アセトニトリルの移動相でイソクラティックに行なった。流量は2.5 ml/分であり、チャート速度は0.25 cm/分に設定した。5 ml面分を調製した。クロマトグラフィーは室温で行なった。各面分の一定部分を凍結させ、A375細胞の増殖阻止活性(CIA)について三重に検定した。

5試験の活性面分(面分21および22)をアールした。アールした物質は合計約4.8 × 10<sup>4</sup> CIA単位を有した。因子はサイズ排除クロマトグラフィー(バイオール(Bio-Biol)TSK-250カラム)により測定して18 kDの見掛け分子量を有することが認められた。

## 例TSK-250面分の増殖HPLCによる精製

前記のアールしたTSK-250面分21および22を0.1% TFAで二倍希釈した。この混合物を室温でμボンドバク-C18カラム(7.8 × 300 mm)(C18<sup>+</sup>として示す)上にイソクラ

ティックについて検定した。活性の大部分は40.7~41.3%のアセトニトリル濃度間から溶出した(保持時間83~88分)。

活性面分をアールし、0.1% TFAで二倍希釈し、室温でμボンドバク-C18カラム(3.9 × 300 mm)(C18<sup>+</sup>として示す)上にイソクラティックに注入した。流量は1 ml/分であり、チャート速度は0.25 cm/分であった。直線勾配を一次溶媒0.1% TFAと二次溶媒n-プロパノール-TFA(0.1%)との間に用いた。勾配条件は0~25%、20分および25~35%、120分であった。面分を調製し、各面分の一定部分をCIAについて検定した。活性の大部分は25~28.5%のプロパノール濃度の間に現われた(保持時間59分)。この見掛け平均面分は約300 ngのタンパク質および約40,000 CIA単位を含有した。

## 実施例3

## 精製オノコスチンMの物理化学的性質

## A. オノコスチンMの特性決定

④アミノ酸配列決定

血清不含 TPA 処理 U937 細胞の 150 μg 組織培養フラスコ中の上澄みから分離された非細胞オンコスタチン M のエンドプロテイナーゼ Lys-C 切断による自動配列分析をモデル 470 A アミノ酸シーケンサ (アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems, Foster City, CA) 製) で行った。

オンコスタチン M の N 末端配列および内部フラグメントを、還元し S-ビリジンエチル化したポリペプチドの、および還元し S-ビリジンエチル化したオンコスタチン M のエンドプロテイナーゼ Lys-C およびスタヒロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) V8 プロテアーゼによる酵素消化から得られたペプチドのマイクロ配列分析により決定した。ペプチドフラグメントを揮発性媒体を用いて逆相 HPLC により精製した。ペプチドをモデル 470 A タンパク質シーケンサー (アプライド・バイオシステムズ社 (Applied Biosystems, Inc.) 製) で自動反復エドマン (Edman)

ーン A) : 即アルブミン、 $M_r = 43 \text{ kD}$  ; キモトリプシンノゲン α、 $M_r = 25.7 \text{ kD}$  ; ラクトグロブリン β、 $M_r = 18.4 \text{ kD}$  ; リゾチーム、 $M_r = 14.2 \text{ kD}$  ; ウストリアシン阻因子、 $M_r = 6.3 \text{ kD}$  ; インスリン A および B 鎖、それぞれ  $M_r = 2.3 \text{ kD}$  および  $3.4 \text{ kD}$ 。オンコスタチン M はレーン B に適用した。

非還元条件下に P A O B にかけたオンコスタチン M もまた 28 kD の見掛け分子量を有し、バンドから電気泳動 (electrophoresis) したタンパク質は A375 細胞の増殖を阻止することが認められた。

⑤オンコスタチン M に対する無々の処理の効果

U937 細胞 ( $RPMI 1640 + 5\% \text{ FCS}$   $7.5 \times 10^4$  細胞/μl に接種) を TPA ( $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) で 3 日間処理した。次いで細胞を培地 (血清不含 RPMI 1640) で洗浄し、上澄みの増殖前に血清不含 (血清不含 RPMI 1640) 培地中で 24 時間インキュベートした。上澄みを 1 N 酢酸または 1 N 水酸化アンモニウムで処理し

特開昭 84-63385 (19)

分解にかけた。フェニルチオヒダントインアミノ酸は逆相 HPLC (アプライド・バイオシステムズ社 (Applied Biosystems, Inc.) 製) により PTH-C18 カラム ( $2.1 \times 220 \text{ mm}$ , A B I) で陽離に酢酸ナトリウム緩衝液/テトラヒドロフラン/アセトニトリル勾配を用いて分析した。

U937 因子 A-<sup>1</sup>A-<sup>1</sup>-<sup>5</sup>G-<sup>5</sup>-<sup>10</sup>C-S-K-B-<sup>15</sup>Y-R-V-L-L-G-G-L-A-N

この配列を現在のクンバタデータベース (PIR レリース 13.0、1987) に登録されたものと比較すると、他の公知配列と有意な配列相同の無いことを示した。さらに、腫瘍増殖因子、リンホトキシン、コロニー刺激因子、インターロイキン 1 または 2、あるいは形質転換性成長因子と相同性がない。

⑥オンコスタチン M の SDS-PAGE

還元条件下に行なった SDS-PAGE にかけた精製オンコスタチン M は第 2 図に示されるように約 28 kD の見掛け分子量を有することが認められた。次のタンパク質を標準として用いた (ン

た。次いでそれを培地 (血清不含 RPMI 1640) に対して透析し、実施例 1 B に記載した検定を用いて A375 中への <sup>3</sup>H-チミジン取り込みを阻止する能力について試験した。

表 1

腫瘍増殖阻因子活性に対する TPA 処理 U937 細胞の上澄みの無々の処理の効果

処 理	上澄みの無々の処理効果			
	0	1:4	1:9	1:19
培地単独	39,780*	--	--	--
不純物上澄み	--	7,206	13,896	16,000
1 N 酢酸	--	6,670	17,073	18,783
1 N-NH <sub>4</sub> OH	--	6,856	15,018	13,923

\* 示したデータは <sup>3</sup>H-TdR 取り込み (カウント毎分) である。

## 特開昭64-63395 (20)

上記結果は透折した上澄み中のオンコスタチンMが1N酢酸および1N水酸化アンモニウムによる不活性化に対し実質的に耐性であることを示す。従って、主成分化合物はかなり強い酸およびかなり強い塩基の両方に対し比較的親和でない。

主成分化合物はまた熱安定性について試験し、56℃に1時間さらした後その活性が保持されるが、しかし95℃に30分間さらした後その活性が実質的にすべて失われることが認められた。

## H) オンコスタチンMの炭水化物組成

オンコスタチンMの炭水化物組成をグリコシダーゼ感受性に対する試験により調べた。実施例5(後記)におけるように調製した免疫沈降物を糖銜液、エンドグリコシダーゼH、またはノイラミニダーゼで処理した(リンズレイ (Linsley)ほか、バイオケミストリー (Biochemistry) (1986) 25: 2978~2986)。エンドグリコシダーゼH、N結合高マンノースオリゴ糖に対する特異性を有する酵素、により処理すると $M_r = 24$  KDの低分子量種を生じた。酸性糖鎖物質の一

部のみがこの酵素に感受性であり、すべての分子が高マンノースオリゴ糖を含有するのではないことを示した。ノイラミニダーゼによる処理は $M_r = 27$  KDの単一バンドを生じ、不純物<sup>14</sup>C標識オンコスタチンMの大ききの不均一性が糖タンパク質コアのシアル酸化における分子不均一性のためであったことを示す。結果はオンコスタチンMの酸性糖鎖物質が高マンノースと複合N結合オリゴ糖鎖との混合物を含有したことを示した。

B. ヒトTリンパ球からのオンコスタチンMの特異性決定

## (1) アミノ酸配列決定

2アミノ末端配列をオンコスタチンM調製物に対する自動エドマン分解により決定した。アミノ酸のフェニルチオヒダントイン誘導体の明確な確認が、主配列に対して位置5, 6, 7, 11, 14および15を除いて残基19まで可能であった。オンコスタチンMのアミノ末端配列は次のように採取された:

1 5 10 13  
A-A-I-Q-X-X-K-K-B-V-X-V-L-Y-K-Q-L-E-K

## 表 2

U937細胞の精製オンコスタチンMによる腫瘍細胞の増殖の阻止

腫瘍細胞	<sup>3</sup> H-TdR取込みの30%阻止を生ずるGI <sub>50</sub> 単位
A649 (肺癌)	21.0
HTB10 (神経芽細胞腫)	81.0
A275 (黒色腫)	0.3

\* 1単位の腫瘍増殖阻止活性 (GI<sub>50</sub>) は実施例1Bに記載した検定を用いてA375黒色腫細胞中への<sup>3</sup>H-TdR取込みの50%阻止を生ずる量として規定される。

精製オンコスタチンMの比活性を基にしてA649、HTB10およびA375細胞中への<sup>3</sup>H-TdRの30%阻止を生ずる濃度 (ng/ml) はそれぞれ約1.4, 4.0および0.015ng/mlであったことが測定された。

残基13までのアミノ酸の確認されたフェニルチオヒダントイン誘導体はホルボールエステル誘導U937細胞株リンパ腫細胞に由来するオンコスタチンMのN末端配列に対して確立されたものに一致した(前記実施例3A(1)参照)。

## (2) SDS-PAGE

最終オンコスタチンM調製物の純度は還元条件下の10%SDS-PAGE法により決定した。残余調製物は高分子量タンパク質により多少汚染された。主ポリペプチドバンドは28,000の $M_r$ を有した。

## 実施例4

## 精製オンコスタチンMの生物活性

## A. 腫瘍細胞増殖の阻止

種々の細胞系に対するオンコスタチンMの効果は前記実施例1Bに記載したように行なった細胞増殖抑制検定を用いて評価した。試験した細胞系にはA849肺癌細胞、HTB10神経芽細胞腫細胞、およびA375黒色腫細胞が含まれた。結果は表2に示されるとおりである。

# B. 腫瘍細胞コロニー形成の阻止

A375細胞を、実施例1Cに記載したようにオンコスタチンMの指示0.1A単位が、またはなしで数日に塗布した(表3参照)。用いた因子はピーク増殖増進阻性(0.1A)を有するC18<sup>2</sup>プロパノールカラム画分からであった。コロニーの数は11日に数えた。

表 3

U937細胞から分離した特異オンコスタチンMによる数日中のA375黒色腫瘍細胞コロニー形成の阻止

GIA 単位* / 250	8日目	コロニー形成の阻止%
250	4	96
83	8	94
27	11	89
45	92	69
0	108	-

\* 1C1A単位に実施例1B中に記載した検定を

表 4

腫瘍細胞および正常細胞増殖細胞の増殖に対するオンコスタチンMの効果\*

	GIA** 単位/250	%阻止	%刺激
実施例1	16	A375 83	M126 25
	4	68	30
	1	46	46
実施例2	27	A375 M7	U7810 28
	9	87	22
	3	70	11
			32
実施例3	75	A375 89	AE49 30
	25	85	22
	8	71	18
実施例4	20	A375 87	SK-MEL38 44
	5	75	25
	1	59	11

\* 示した結果はP-チミジン取り込みの%阻止を

# 特開昭64-63395(21)

用いてA375細胞中へのP-チミジン取り込みの50%阻止を生ずるオンコスタチンMの濃度として規定した。

## C. 正常および形質転換細胞に対するオンコスタチンMの発見的効果

ヒト腫瘍細胞(A375黒色腫瘍細胞、A549肺癌細胞、HBT10神経芽細胞腫瘍細胞およびSK-MEL28黒色腫瘍細胞)を $9 \times 10^3$ 細胞/ウェルに、および正常細胞増殖細胞(W126細胞およびW138細胞)を $1.5 \times 10^3$ 細胞/ウェルに96ウェルプレート中に接種した。A375細胞に対するピーク増殖増進性を有するC18<sup>2</sup>カラムの画分から得られた特異オンコスタチンMの種々の濃度を用いた。検定は前記実施例1Bに記載したように行なった。結果は表4に示される。

たは%刺激である。

\*\* 1C1A単位はA375細胞中へのP-チミジン取り込みの50%阻止を生ずるオンコスタチンMの量である。

表4中の結果はオンコスタチンMが腫瘍細胞の増殖を阻止したが、しかし正常細胞の増殖を阻止しなかったことを示す。むしろそれは正常細胞の増殖を実際に刺激した。

種々の細胞の複製に影響を与えるPBL由来のオンコスタチンMの能力もまた調べた。マウスL929細胞は1,000 GIA単位/250までを用いるPBL由来のオンコスタチンMに対し感受性でなかった。ヒト線維芽細胞W126の増殖は1,000 GIA単位/250で促進することにより刺激された。有糸分裂後72時間における正常ヒトTリンパ球増殖は500 GIA単位/250まで促進されなかった。

## D. オンコスタチンMにより促進された腫瘍細胞増殖細胞および正常ヒト線維芽細胞中へのP-

チミジン取込みに対する逐次的効果に加えて、3細胞型のオンコスタチンMによる処理の3日後の形態および細胞数に対する逐次的効果もまた、第1図に示されるように認められた。

用いたオンコスタチンMはA375細胞の増殖の阻止に対するピーク効果を有するHPLC-C18<sup>+</sup>カラム成分であった。第1図は、A375黒色腫細胞の一連の顕微鏡写真であり、それは不処理(A)、処理オンコスタチンM5増殖阻止単位(CIA)単位(B)または100単位(C)であった。W138腫瘍細胞の顕微鏡写真は不処理(D)、処理5単位CIA(B)または100単位(F)であった。細胞は0.5%メタノール中のタリスタルバイオレットで染色した。倍率=88X。

B. ノードマウス中のA375細胞の増殖の阻止  
ノードマウスに、前記実施例1Dに記載したようにA375細胞を注射した。腫瘍が触知可能になった後、マウスに腫瘍の近位にPBS(対照)またはオンコスタチンM400ngを含むPBSを

対照動物中のその大きさの約1/3にすぎなかった。

表6に前記マウスのそれぞれの腫瘍の重量(mg)が示される。オンコスタチンM処置マウスから分離した腫瘍は対照処置マウスの腫瘍の重量の約1/3であった。

表 6

マウスID	処置	腫瘍重量 (mg)
98	PBS	640
93	PBS	440
92	PBS	480
94	オンコスタチンM	100
97	オンコスタチンM	140
95	オンコスタチンM	200

#### V. 放射受容体検定

##### (1) 検限定数および受容体濃度

腫瘍受容体に対するオンコスタチンMの結合を实

験8マウスに注入した。

3マウスの各群中の腫瘍の最大大きさ(mm<sup>3</sup>)を3~3日毎に測定した。腫瘍の最大大きさは表5に示され、31日後の腫瘍重量は表6に示される。

表 5

処置後日数	腫瘍最大大きさ (mm <sup>3</sup> )	
	PBS	オンコスタチンM
-1	30	30
0	70	50
3	118	64
5	130	66
7	160	90
10	180	88
12	210	100
14	268	118

オンコスタチンMで処理したマウス中の腫瘍は

実施例1Bに記載した放射受容体検定を用いて実証した。試験したヒト腫瘍細胞にはA375(黒色腫)；A375(黒色腫)；M61109(黒色腫)；T24(膀胱癌)；A549(肺腺癌)；H2981(肺癌)；H1477(黒色腫)；M6100(黒色腫)；およびMCF(乳癌)が含まれた。111I-オンコスタチンMの結合は特異的で、飽和性であり、他の公知ポリペプチド増殖調節物質(後記参照)により阻止されなかった。種々の細胞系で得られた結合データのスキッチャート分析は111I-オンコスタチンMが約10<sup>-6</sup>MのK<sub>d</sub>で腫瘍当たり1~2×10<sup>6</sup>結合部位に結合したことを示した。

##### (2) オンコスタチンM受容体の特異性

オンコスタチンM受容体の特異性は111I-オンコスタチンM(30~500ng/mlで)のA375またはA549細胞に対する結合に対して拮抗する若干の他のポリペプチド成長因子の能力を評価することにより決定した。試験した成長因子には、腫瘍増殖因子α(20ng/ml)；インクロー

## 特開昭64-63395 (23)

イキン<sup>1</sup>-B (50 μg / ml) ; イングーフ  
エロン (2.5 μg / ml) ; 高度成長因子 (2.5  
μg / ml) ; 癌細胞成長因子 (2.5 μg /  
ml) ; 形質転換性成長因子β型 (2.5 μg /  
ml) ; プタインスリン (2.5 μg / ml) ; 定  
化性ペプチド (ホルミル-M-L-P, 50 μM) ;  
Lys<sup>3</sup>ボンベリン (50 μM) ; および Tyr<sup>1</sup>-ボン  
ベリン (1 μM) が包含された。これらのいずれ  
も<sup>125</sup>I-オンコスタチンMの結合に対し有意な阻  
止活性を示さなかった。

## D. SDS-PAGE分析

オンコスタチンM受容体を確認するために<sup>125</sup>I-  
オンコスタチンMをジスクシンイミジル誘質を  
用いてその受容体に化学的に共価結合させた。反  
応生成物をSDS-PAGEにより調べると、Mr  
~180,000の単一交差結合複合体が認められた。  
この複合体は若干の細胞系で認められた。

## 実施例5

## オンコスタチンMに対する抗体の特異性

## A. ペプチド合成

抗血清はBブーストの3週後に得られた。

## C. オンコスタチンMのヨウ素化

部分精製オンコスタチンMの試料を公認操作を  
用いてヨウ素-125で放射性標識した (リンス  
レイ (Linsley) ほか、プロシーディングス・オブ  
・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス  
(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985)  
82: 358~360) 。100,000 cps を含む標  
識物の一大部分をオンコスタチンMのN末端  
17アミノ酸を指向するウサギ抗血清とN末端ペ  
プチド (オンコスタチンMのN末端17アミノ酸)  
の不在または存在 (8 μg) 下に混合し (最終稀  
釈1:20) 、記載されたように免疫沈降分析に  
かけた (リンスレイ (Linsley) ほか、バイオケミ  
ストリー (Biochemistry) (1986) 25:  
2978~2986) 。

特異的には、8 μg を含む1管を、0.1 % BSA  
を含む10 μg TNBN (20 mM トリス pH 7.5、  
5 mM EDTA、150 mM NaCl、0.05 % ニ  
デット (Nalco) P-40) 中のN末端ペプチド

オンコスタチンMタンパク質の残基8~19に  
相当するペプチドを、記載されたようにバックマ  
ン (Backman) 自動装置で固相法により合成した  
(ゲントリー (Gentry) ほか、ジャーナル・オブ  
・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)  
(1983) 258: 11219) 。該ペプチド  
を「価-高」HPL操作を用いて樹脂から切断した  
(タム (Tam) ほか、ジャーナル・オブ・ジ・アメ  
リカン・ケミカル・ソサイエティー (J. Am. Chem.  
Soc.) (1983) 105: 6442~6445) 。  
精製は固相用HPLCにより行なった。

## B. 抗体の検出

該ペプチドを認識されたようにウレィーグロブ  
リンに結合させた (ゲントリーほか (Gentry and  
Linton) 、ビロロジー (Virology) (1980)  
152: 421~431) 。ニューージーランドシ  
ロウサギを、記載されたように皮下に4部位で感  
作し、ブーストした (5回) (ゲントリーほか  
(Gentry and Linton) 、ビロロジー (Virology)  
(1986) 152: 421~431) 。用いた

2 μg とともに、4℃で30分間インキュベ  
ートした後0.1 % BSA および40 mM ジチオトレ  
イトール (DTT) を含む85 μl TNBN中の<sup>125</sup>I-  
オンコスタチンMを加えた。5 μl 抗血清を含  
む7管を、0.1 % BSA および40 mM-DTTを  
含むTNBN 85 μl 中の<sup>125</sup>I-オンコスタチン  
Mとともに4℃で30分間インキュベートした後  
10 % ホルマリン固定スタヒロコッカス・アウレ  
ウス (Staphylococcus aureus) ; ペンシリン  
(Penicillin)、カルビオケム (Calbiochem) )  
50 μl を加えた。

4℃において30分間さらにインキュベートし  
た後、管をマイクロフュージ (microfuge) し、ペ  
レットを1 % TNBNで4回洗浄した後PAGE  
分析にかけた。Mr=22 kDの抗原バンドが免  
疫沈降物のSDS/PAGE分析後に認められた。  
この種の沈降はオンコスタチンMのN末端17ア  
ミノ酸に相当する非標識ペプチドの過剰の包含に  
より阻止され、沈降がこのペプチドに対し特異的  
であったことを示した。

## 特開明 64-83395 (24)

## 実施例 8.

## オンコスタチンMと他の成長因子との相乗効果

A: A375細胞に対するオンコスタチンM、

TCF- $\beta$ 1およびr-IPN-rの効果

高糖型TCF- $\beta$ 1、組織元r-インク-フェロン(r-IPN-r)およびオンコスタチンMのA375細胞に対する増殖阻止活性を測定し、TCF- $\beta$ 1とオンコスタチンMとの間、TCF- $\beta$ 1とr-IPN-rとの間およびオンコスタチンMとr-IPN-rとの間のA375増殖阻止における相乗作用の可能性を試験した。TCF- $\beta$ 1はM $\mu$ 1L $\mu$ 増殖阻止活性の単位で、r-IPN-rは抗ウイルス活性の単位で、またオンコスタチンMはA375増殖阻止活性の単位で示される。個々に試験したときに阻止を生じないかまたは最小増殖阻止を生ずるにすぎないTCF- $\beta$ 1(1~30 U/ $\mu$ g)およびオンコスタチンM(0.5~10 U/ $\mu$ g)の濃度を選んだ。

TCF- $\beta$ 1およびオンコスタチンMによる同時増殖阻止に対する相乗的応答が試験した全組合せで

TdR 取込みの阻止を、前記実施例 1 に記載した検定を用いて比較した。加薬はオンコスタチンM単独、TNF- $\alpha$  (アムゲン・バイオテクノロジー (Amgen Biologics)、ヒト組織元TNF- $\alpha$ ) 単独、またはオンコスタチンMとTNF- $\alpha$ との組合せで処理した。

表 7

処 理	*E-TdR取込みの阻害阻止 %	
	A375細胞	MCF-7細胞
オンコスタチンM	17	18
TNF- $\alpha$	7	30
オンコスタチンM + TNF- $\alpha$	48	79

\* 2 因子を合せた計算阻止% (加乗効果) は A375細胞およびMCF-7細胞に対しそれぞれ24%および48%であった。

生じ、エンハンスメントの程度は予期加乗効果の2.5~3.1倍の範囲内であった。例えば、細胞増殖は、個々にそれぞれ7%および12%細胞増殖を阻止したTCF- $\beta$ 1 3.4 U/ $\mu$ gおよびオンコスタチンM 1.8 U/ $\mu$ gにより約48%阻止された。予期された加乗効果は19%であった。測定された実効的応答は2.5倍高い。TCF- $\beta$ 1の抗増殖活性がオンコスタチンMのそれと実数に相乗的であったかどうかを決定するために5用量組合せのデータをイソボログラム(isobologram)にプロットした。このグラフ分析(示さず)において、加乗効果に対する線より下の試験点を連結する線の認められた新しい離散が相乗的相互作用の指標であった。加乗抗増殖応答はオンコスタチンM(1~5 U/ $\mu$ g)とIPN-r(1~10 U/ $\mu$ g)の組合せをA375細胞に同時に加えたときに認められた。

B: A375およびMCF-7細胞に対する

オンコスタチンMおよびTNF- $\alpha$ の効果

A375細胞およびMCF-7細胞中への\*

表7はA375細胞の複製のオンコスタチンM単独、TNF- $\alpha$ 単独、および両因子の混合物の試験管内阻止(\*E-チミジン取込みの阻止により測定した)の結果を示す。示されるように、A375細胞のオンコスタチンMとTNF- $\alpha$ との混合物による処理はそれぞれの因子単独より大きいA375細胞の複製の阻止程度並びに各因子別々の阻止の加乗水準を基にして予期されたより大きい阻止程度を与えた。

表7はまたオンコスタチンM単独、TNF- $\alpha$ 単独、および両因子の混合物によるMCF-7乳癌細胞の試験管内複製の阻止の結果(\*E-チミジン取込みの阻止により測定した)を示す。オンコスタチンMとTNF- $\alpha$ との混合物によるMCF-7乳癌細胞の処理はそれぞれの因子単独より大きいMCF-7乳癌細胞の複製の阻止程度および各因子別々の阻止の加乗水準を基にして予期されたより大きい阻止程度を与えた。

上記結果はオンコスタチンMおよび腫瘍死因子が一定腫瘍細胞の複製の阻止に相乗的であるこ



## 特開昭64-63395 (25)

とを示す。

## 実施例 7

## オンコスタチンMのDNAクローン化およびDNA配列

## A. cDNAライブラリーの調製

ホルボール18-ヒリスチート18-アセテートPMA (10<sup>6</sup>g/μl) を含む増地で、18、36および54時間処理したU937から得られたポリ(A)<sup>+</sup>RNAをアールし、ホイ(Huynh)ほか、「DNAクローン化：実用的方法 (DNA Cloning Techniques: A Practical Approach)」グローバー(D. Glover) (編) (1984) により実質的に記載されたようにcDNA合成に用いてλgt10ベクター中へクローン化した。簡単に記載すると、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAをオリゴdT 50 pmolの存在下に逆転写させた。DNAポリメラーゼIを用いて第8鎖を合成し、cDNAを8ヌクレオチドで処理してヘアピンループを除去した。次いでcDNAを末端デオキシスクレオチド転移酵素で処理することによりdG末端連結

した。dG末端連結cDNAを次いでパイオゲルA-50カラム上でクロマトグラフを行なって300bpより小さいcDNAを除去した。サイズをそろえたdG末端連結cDNAを、5'端からAATT次いで12デオキシリボリン酸基を含む一本鎖16ヌクレオチド長リンカー分子の存在下にEcoRI (切断λgt10中へ連結させた) (ウェブ(Webb)ほか、1987))。連結したDNAを試験管内でパッケージし(グロスベルド(Grosfeld)ほか、ゾーン(Gene) (1981) 13:227~237)、ファージを用いて大腸菌(E. coli) C80Hf1<sup>+</sup>を感染させた。この方法は3×10<sup>8</sup>組換え体/μg cDNAを与えた。ニトロセルロースフィルターブランクリフトを二回に行ないフィルターを洗ひ、最良増殖35~50ヌクレオチド長プローブを用いて選べた。オリゴヌクレオチドプローブは自動反復エドマン分解により得られたペプチド配列から誘導した。精製オンコスタチンM配列はタンパク質のN末端から誘導するかまたはプロテアーゼ発生リシンペプチドの

配列化によった。

λgt10ライブラリーの初期スクリーニングは50mer オリゴヌクレオチドプローブを用いて行なった。プローブはリシンペプチドから誘導した。ペプチド1:

(K) A G D L E R S Q L N I E D L E R  
3' TTC CGG CTC CTC GAC CTC GCG AGA CCG GAC TTG TAA CTC CTG GAC CTC TT

(\*\*P) 標識した前記オリゴヌクレオチドに正反応性を示すλgt10クローンをブランク検出した。8クローンが得られた。サザンブロット分析はクローン中の正反応性cDNA挿入片が600bp~3kbの範囲内にあったことを示した。次いでサザンブロットを32mer オリゴヌクレオチド(エンコーディングアミノ酸53~64)および41mer オリゴヌクレオチド(エンコーディングアミノ酸22~38)を用いて行なった。単に1つのクローンが3放射線感度オリゴヌクレオチドプローブすべてと正反応性を示した。

λgt10クローン(λOM) のcDNA挿入片

は約2.1kbであることが認められた。5'および3'端におけるEcoRI部位により誘導されたcDNA挿入片をプラスミドベクターpEMBL18 (デンタ(Denta)ほか、ニュクリーグ・アレップ・リサーチ(Nucleic Acid Res.) (1983) 11:1645~1655) のポリリンカー領域のEcoRI部位中にサブクローンした。組換え体をpOnoM48と呼称した。

## B. cDNAクローンの制限部位地図作成

オンコスタチンMタンパク質をコードするクローンpOnoM48の制限地図はプラスミドDNAの標準1または2相化により得られた。コーディング領域は4PstI部位、1BglII部位および1SmaI部位を有する。

## C. オンコスタチンMをエンコードする2.1kb

## cDNAクローンの配列

2.1kbクローンpOnoM48の全ヌクレオチド配列を決定した(第3図参照)。読取り枠はヌクレオチド253で開始し、終結コドンヌクレオチド1670にある。読取り枠は塩基開始メチ

## 特開昭64-83895 (26)

オニンから上流に19アミノ酸を有する。断断された開始メチオニンから2アミノ酸上流にさらに1メチオニンが存在する。

断断り途中の第1および第2メチオニンの両方をコードするヌクレオチド配列は開始メチオニンに対する共通配列と一致しない(コザク (Kozak)、セル (Cell) (1986) 44:283~292)。同メチオニンは共通配列と同程度の類似性を有する。しかし、第2メチオニンは、精製オンコスタチンMのアミノ末端配列(前記およびザリング (Zarling) ほか、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA (1986) 83:9739~9748参照)がこのメチオニンの次のアラニンに始まるので、開始メチオニンであると思われる。

分離したcDNAクローンから演繹されたオンコスタチンMポリペプチドのアミノ酸配列はタンパク質が28,000の分子量で288個のアミノ酸を有し、それが精製オンコスタチンMのポリアタリ

ルアイドゲル電気泳動により決定されるMr = 28,000 (ザリング (Zarling) ほか、1986前掲) によく一致することを示す。

初期のタンパク質化学研究(ザリング (Zarling) ほか、1986前掲)はオンコスタチンMが糖タンパク質であることを示した。cDNAクローン配列は2潜在的N-グリコシル化部位(ハバード ほか (Hubbard and Ivatt)、アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー (Ann. Rev. Biochem.) (1981) 50:555~583)がアミノ酸78および198に位置することを示唆する。ヌクレオチド由来のタンパク質配列はオンコスタチンMが単にN末端および約アミノ酸75における若干のアミノ酸の若干の糖鎖水性伸長を有し、非常に親水性であることを示す。

cDNAクローンは384bp非翻訳5'および1054bp3'非翻訳領域を有する。しかし、分離されたクローンはポリA尾部およびポリアダニル化開始部位を欠いた。

D. 細々の細胞質中のポリ(A<sup>+</sup>)RNA

第4図は(32P)標識ニック翻訳2.1Kb cDNA挿入片をプローブとして用いるノーザンブロット分析を示す。PMAで処理しない、またはホルホルエステルPMAで16、36および62時間処理したU937細胞(組織球リンパ腫細胞系)から分離したポリアダニル化RNAをハイボンド (hybond) N膜上にブロットした1.8%ホルムアルデヒドアゲロースゲルで試験し前記ブロットで調べた。PMA処理U937細胞は約2.1Kbおよび1Kbの大きさの2つのオンコスタチンM特異的mRNA種を示した。PMA処理の18時間後オンコスタチンMポリ(A<sup>+</sup>)RNAが発見された。誘発されたポリ(A<sup>+</sup>)RNAの量は38時間処理後にさらに高められたが、しかしPMAによる処理の52時間後に低下した。

さらに、それとは異なる結合条件下に、処理および非処理U937細胞の両方の中の他の500bpフラグメントがプローブに対しハイブリッド形成した。非PMA処理U937細胞は少量のオンコスタチンM mRNAを示した。

オンコスタチンM mRNAバンドは上皮、肝臓および胎盤、HeLa並びにIM9細胞系中に認められた。mRNAは正常ヒト胎盤中に多量に、肝臓および上皮中に少量認められた。これらのすべての場合にニック翻訳オンコスタチンM cDNAクローンと反応するmRNAの大きさは約1.5Kbであった。しかし、これらの組織中のmRNAの大きさはPMA処理U937細胞中に認められたものとは異なった。

## 実施例8

## 組織系細胞中に誘発されたオンコスタチンM

## A. クローン化および調製プラスミドの複製

(1) プラスミドpBM18/NDP

1987年10月30日に発出した同時係属米国特許出願第15,139号(リウ (Liu) ほか)、代理人管理番号CT-1838、参照。

(2) プラスミドpBM11はBamHI制限部位でバクテリオファージλN遺伝子の3'3'末端アミノ酸をロードするDNA配列の下流異質遺伝子のクローニングを可能にする。48℃で±1857℃

## 特開昭64-63395 (27)

低感受性レプレッサーの不活性化により  $\lambda$  P L プロモーターが誘発されると、異質遺伝子生成物は N 末端配列が N 遺伝子のそれである融合タンパク質の C 末端部分として発現される。

(3) プラスミド  $\phi$  BM11M4 は  $\phi$  BM11 から誘導され、異質遺伝子を N 遺伝子の開始メチオンの直後の BamHI 制限部位においてクローン化させる。

(4) プラスミド  $\phi$  BM11M3/PAD はプラスミド  $\phi$  BM11M4 から誘導され、修飾アルカリ性ホスファターゼシグナル配列から下流の HindIII、SmaI または BamHI において異質遺伝子をクローン化させる。

5. プラスミド  $\phi$  SM1、2/lac は、pBR322 (ホリバー (Hollivar) ほか、ジーン (Gene) (1977) 2:195) の複製オリジンおよび  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、 $\text{C}^{\text{ro}}$  遺伝子 (ロバーツ (Robert) ほか、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナルアカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA (1979)

pOnoM48-15 ベクターを生じた。オンコスタチン M の 5' 非コーディング配列を pOnoM48-15 の SmaI および BglII 二重消化により除去、合成 80bp SmaI-BglII フラグメントにより置換して新 BamHI および  $\text{XbaI}$  部位を与えた。生じたクローンは pOnoMBV5 と呼称された。80bp フラグメントの配列は次のとおりである。

5' - TCGACGGATCCACCATGCGCGGCTTCGGCAGCTGCTCG

3' - GCCTAGCTGGTACCGCCGCTAGCCGTCGACCGAC

AAAGAGTAGCGGCTGCTCCTTCGCGAGCTCCAGAACGAGACA - 3'

TTTCTCATGCGCGCAGGAGGAACCGGTGAGGCTCTTCGCTCTGTCTAG - 5'

オンコスタチン M のコーディング配列を XhoI および SmaI 二重消化により pOnoMBV5 から 0.7Kb フラグメントとして切出し、pUC8 ベクター中へ SmaI 部位でクローン化した。 $\text{XbaI}$  配列に相対するコーディング配列を有する cDNA 挿入片を含むクローン pOnoMBV2

18:780-784) の lac プロモーターおよびリボソーム結合部位を pLC300 (ギャレンテ (Guarente) ほか、セル (Cell) (1980) 20:543-553) の  $\lambda$ -2 融合遺伝子にスプライシングすることにより発注された。

## B. 組換えオンコスタチン M 遺伝子の構築

(1)  $\phi$  SM1、2/lac - OnoM の構築

この構築において、オンコスタチン M 遺伝子に対する全コーディング配列が N 末端に  $\lambda$  cro タンパク質の初めの 21 アミノ酸を有する融合タンパク質の C 末端部として発現される。

## a. pOnoMBV2

2.1Kb オンコスタチン M cDNA は BcoRI 消化により  $\lambda$  ファージ組換え体、 $\lambda$  48 (実験例 7A 参照) から切出された。挿入片を pEMBL18 (デンタ (Denta) ほか、ユークリーク・アシッド・リサーチ (Nucl. Acid Res.) (1983) 11:1648-1655) 中へ BcoRI 部位でクローン化すると lacZ' 配列に相対するオンコスタチン M コーディング配列を有するクローン

2 が分離された。クローン pOnoMBV2 から切出された 0.7Kb NcoI-BamHI および 0.7Kb BamHI-BamHI フラグメントを用いて  $\lambda$  P L 基 ( $\phi$  BM16/NDP/OnoM) および  $\phi$  SM1、2/lac 基 ( $\phi$  SM1、2/lac-OnoM) の発現ベクターをそれぞれ構築した。

b.  $\phi$  SM1、2/lac - OnoM の複製

オンコスタチン M をエンコードする DNA フラグメントを pOnoMBV2 から BamHI により切出し、ゲル電気泳動により精製した。次いでそれを発現ベクター、 $\phi$  SM1、2/lac、中へ BamHI 部位でクローン化した。該 DNA を大腸菌 (E. coli) HB101 の形質転換に用いた。クローン pOnoMB6 が分離され、予期配列をもつことが確認された。

(2)  $\phi$  BM16/NDP/OnoM の構築

## a. 修飾オンコスタチン M 遺伝子 フラグメントの複製

修飾オンコスタチン M 遺伝子を含むプラスミド pOnoMBV2 を NcoI および BamHI で

## 特開昭64-63385 (28)

消化し、700bp Nco I - Bam HI オンコスタチンM遺伝子をゲル精製した。このフラグメントは遺伝子の5'端におけるNco Iオーバーハング、および遺伝子の3'端におけるBam HIオーバーハングを有した。

## b. pBM16/NDPの調製

プラスミドpBM11/NDP/VGF (1987年10月30日に提出した同時係属米国特許出願第115,139号(リウ(Liu)ほか)、代理人整理番号CT-1836参照)を、pBM16/DPプラスミドフラグメントから合成遺伝子TUVを除きNco IおよびBam HIで消化した。pBM16/NDP Nco I - Bam HI 5.5kbプラスミドフラグメントをゲル精製した。このフラグメント中のNco I部位はN遺伝子の初めの32アミノ酸をコードするヌクレオチド配列の下流、不安定ジベチドAa p-Proをコードする配列の直後に位置する。

## c. pBM16/NDP/OnoMの連結および分離

製した。このフラグメントは遺伝子の5'端におけるNco Iプラントエンド、および遺伝子の3'端におけるBam HIオーバーハングを有した。

## b. pBM11M3/PADフラグメントの調製

修飾アルカリ性ホスファターゼシグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含むプラスミドpBM11M3/PADを、シグナル配列のすぐ下流を切断するHind IIIで消化した。オーバーハング端をDNAポリメラーゼのクレンウ(Klenow)フラグメントを用いて満たしてプラントにした。白じたDNAをさらにPvu Iで消化し、600bp Hind III (プラント) - Pvu Iフラグメントをゲル精製した。

プラスミドpBM11M3/PADをまたBam HIおよびPvu Iで消化し、5kb Bam HI - Pvu Iフラグメントをゲル精製した。

## c. pBM11/PA/OnoMの連結および分離

700bp Nco I (プラント) - Bam HI オンコスタチンM遺伝子フラグメント、pBM11

修飾オンコスタチンM遺伝子の700bp Nco I - Bam HIフラグメントとプラスミドpBM16/NDPのNco I - Bam HIフラグメントとをT4リガーゼで一緒に連結し、適格HB101大腸菌(E. coli)中へ形質転換した。形質転換体を、サンガージデオキシ法を用いるヌクレオチド配列決定により正しい構築についてスクリーニングした。正しいコロニーを選びpBM16/NDP/OnoMと呼称した。

## d. pBM11/PA/OnoMの構築

## a. 修飾オンコスタチンM遺伝子フラグメントの調製

修飾オンコスタチンM遺伝子を含むプラスミドpOnoMVV2をNco Iで消化し、5'オーバーハング端をS1ヌクレアーゼによる処理により除くとプラントエンドフラグメントが残った。ヌクレアーゼ処理は開始メチオニンに対するコドンを除いた。プラスミドをさらにBam HIで消化し、700bp Nco I (プラント) - Bam HI オンコスタチンM遺伝子フラグメントをゲル精

M3/PADの680bp Hind III (プラント) - Pvu IフラグメントおよびpBM11M3/PADの5kb Bam HI - Pvu IフラグメントをT4リガーゼを用いて一緒に連結し、適格HB101大腸菌(E. coli)中へ形質転換した。正しい構築はサンガージデオキシ法を用いるヌクレオチド配列決定により決定した。正しいコロニーを選びpBM11/PA/OnoMと呼称した。

## C. 組換えタンパク質の調製

## i. 組換え細胞培養

## a. pBM11/2/lac-OnoMを用いるオンコスタチンMの調製

pOnoM26を含む大腸菌(E. coli)株RB791 (tryA36, strA, LacI<sup>-</sup>, L<sup>-</sup>, J<sup>-</sup>, M<sup>+</sup>)を対数期まで増殖させ、イソプロピルβ-D-チオガラクトシドにより37℃で4時間振とう下に誘発させた。細胞を収穫し、組換えオンコスタチンMの存在について分析した。

## b. pBM16/NDP/OnoMを用いるオンコスタチンMの調製

## 特開昭64-63395 (29)

酸阻製性ジベチド (DP) に融合したバクテリオファージ M 遺伝子の初めの 32 アミノ酸および融合 OncM 遺伝子をエンコードするプラスミド pBM16/NDP/OncM を含む大腸菌 (E. coli) HB101 株を 30℃ で増殖させた。約 0.9 の OD600 で温度を、PL プロモーターを誘発し、NDP/OncM 融合遺伝子の転写および翻訳を可能にする温度感受性レプレッサーを不活性化すると 42℃ にあげた。融合タンパク質はバクテリオファージ M 遺伝子の 32 アミノ酸末端部、次に酸不安定ジベチド Aα-D-Pro、次にその N 末端メチオニンを含むオンコスタチン M の 228 個のアミノ酸を有する特徴を有する。

## c. pBMX を用いるオンコスタチン M の調製

82bp フラグメントを次のように化学合成した。

5' - CATGGCCATTGAGGCGCGCTGCGATCGCCAGCTCTCGAAG  
3' - CGGTAACTTCCCGCGCGAGCGCTAGCGGTGAGCGAGCTTT  
GAGTACCGCTGCTGCTGCTGCGCGAGCTCCAGAGCGAGACA - 3'  
CTCATCGCGCGAGGAGGAGCGGTGAGGCTGCTGCTGCTGCTAG - 5'

(0.5 M - NaCl、1.0 M - EDTA、5.0 mM リン酸ナトリウム) 40 mM 中に懸濁し、超音波処理により溶解した。融合タンパク質を遠心分離により細胞溶解物から分離した。融合タンパク質は次のように粗製した 8 M 尿素溶液 180 mM でそれぞれ 16 時間連続的に抽出した：溶液 (I) 20 mM トリス、pH 5；溶液 (II) 20 mM トリス、pH 8；溶液 (III) 50 mM トリス、pH 11。融合タンパク質の大部分は溶液 (I) および (II) により可溶性化されたが、粗製 OncM は溶液 (III) による処理まで不溶性であった。

## d. 粗製分子の再生

溶液 (III) 抽出物を次いで再生緩衝液 (1 M グアニジン HCl、1.2 M 酸化グルタチオン、0.8 M 還元グルタチオン、20 mM トリス HCl、pH 8.0 ~ 9.0) に対して 24 時間透析した。pH を < pH 8.0 に低下すると生物活性 OncM の収率が 100 倍低下を生じた。再生後、タンパク質を C1A における試験前に 1 N 酢酸に対して透析した。

## 変換例 9

82bp フラグメントおよび pOncMVV2 から分離した細胞抽出 OncM cDNA (Bald - Sind III) を NcoI および Hind III 二重消化により調製した pBM16/NDP/OncMVV ベクター中へ転写した。DNA を用いて大腸菌 (E. coli) DH5α を感受性化した。クローム pBMX が分離され、予期配列をもつことが確認された。コーディング配列が、成熟 OncM の N 末端に正確に融合した -I-E-G-R-、因子 X 領域部位、を含むので、pBMX により生成される粗製タンパク質は -I-E-G-R- の R 残基で開始し、活性化因子 X の処理後真正 N 末端配列を有する成熟 OncM を生ずる。類似の操作を用い、pBM16/NDP/OncM からオンコスタチン M の調製に関し pBMX を用いてオンコスタチン M を調製した。

## 例 10. 粗製オンコスタチン M の調製

粗製 OncM 融合タンパク質を大腸菌 (E. coli) から次のように精製した：大腸菌 (E. coli) の 500 ml 培養の細胞ペレットを PNE 緩衝液

## 哺乳類細胞中に発現されたオンコスタチン M

## A. クロームおよび粗製プラスミドの調製

## (i) プラスミド pSV2Neo

プラスミド pSV2Neo はサザン (Southern) ほか、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジネティクス (J. of Mol. and Applied Genetics) (1982) 1: 327 ~ 341 に記載されている。

## (ii) プラスミド pM3M

プラスミド pM3M (アルファ (Aruffo) ほか、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA (1987) 84: 1836 ~ 1839) はアルファ (Dr. Alessandro Aruffo and Dr. Brian Seed) から入手した。簡単に記載すると、該プラスミドは pSV (リトル (Little) ほか、モレキュラー・バイオロジー・アンド・メディシン (Mol. Biol. Med.) (1983) 1: 473 ~ 488) から合成転写単位をサブレッサー・RNA 遺伝子と SV40 オリジンとの間に挿入

## 特開昭64-63395 (30)

入することにより得られる。転写単位はHIV LTR-67~+80配列に融合したエンハンサーの直前のヒトサイトメガロウイルス(CMV) AD189からなるキメラプロモーターからなる。LTR+80配列のすぐ下流は2B'oxi部位を含むポリリンカーである。B'oxiはXhoI部位およびXbaI部位により隣接される。ポリリンカーの下流はスモール・抗原スプライスおよびpSV2由来の初期領域ポリアデニル化シグナルである(サザン(Southern)ほか、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジネティクス(J. Mol. and Applied Genetics) (1982) 1: 327~341)。p3Mプラスミドは初めにポリリンカーのB'oxi部位中へクロン化したT細胞抗原に対するcDNA配列を有した。このcDNAはXhoIによる消化により除去した。次いでプラスミドをアグローススラブゲル電気泳動により精製し、相補XhoI配列の連結により再環化した。

(d) プラスミドpSV2.8.TGFはゲントリー

I部位を有する癌腫オンコスタチンMを含むプラスミドpOncoM.VV2を、3'端におけるコーディング領域を超えるポリリンカー領域中のBcoRI部位で切断した。その部位をDNAポリメラーゼIのクレンウフラグメントで満たすことによりプラントにした。Hind IIIを用いて5'端における開始メチオニンを越えるポリリンカー領域中に位置するHind III部位でフラグメントを切断した。700bp Hind III-BcoRI (プラントエンド) フラグメントを塩融点アグロースゲル上の分離により精製した。

b. ネオマイシン耐性遺伝子を欠く4Kb pSV2フラグメントの調製

プラスミドpSV2NeoをHpaIで切断し、DNAポリメラーゼIのクレンウフラグメントで満たしてフラグメントをプラントエンドにした。プラスミドをHind IIIで消化し、塩融点アグロース上で分離した。得られた4KbフラグメントはSV40初期プロモーター、イントロンおよびポリアデニル化シグナルを有した。

(Gentry) ほか、モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.) (1987) 1: 3418~3427に記載されている。

(M) プラスミドpOncoM.VV2

実施例8B(1)a参照。

(ii) プラスミドpSV2.dhfr (サブライニ(Subrnan)) ほか、モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.) (1981) 1: 854~864) はマウスジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr) 遺伝子をSV40シミアンウイルスプロモーターの制御下に含む。

(iii) プラスミドpSV2OncoMはオンコスタチンM遺伝子をSV40シミアンウイルスプロモーターの制御下に含む(サブライニ(Subrnan)) ほか、モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.) (1981) 1: 854~864)。それは次のように調製した。

a. pOncoM.VV2の700bp Hind III-BcoRI (プラント) フラグメントの調製

6' 端にNcoI部位および3' 端にBamH

a. pSV2OncoMの連結および分離

pOncoM.VV2の700bp Hind III-BcoRIプラントフラグメントをNeo耐性遺伝子を含むHind III-HpaIフラグメントを欠く4Kbフラグメントと連結させた。生じたプラスミドはpSV2OncoMと称した。4~7Kb pSV2OncoMはオンコスタチンM遺伝子に対するSV40初期プロモーター-5' およびイントロン並びにオンコスタチンM遺伝子に対するポリアデニル化シグナル3' 近位を有した。

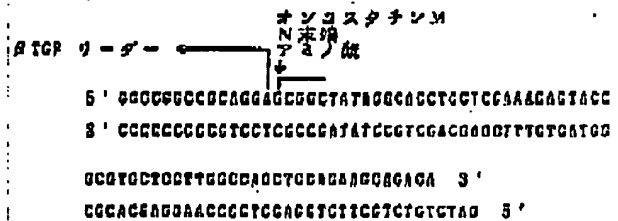
B. 組織系オンコスタチンM遺伝子の調製

(iv) pSV2.8OncoMの構築

オンコスタチンM cDNA配列は、リーダーペプチドとして働き、タンパク質の細胞外への分泌を補助する疎水性ドメインを有しないタンパク質中に翻訳する。哺乳類発現ベクターを、オンコスタチンM遺伝子がタンパク質を産生できるがしかし分泌ドメインを欠くために細胞の外へ輸送できないと考えて作った。この問題を克服するためにプラスミドを作り、その中でサルβTGFリ

特開2004-63395 (31)

合成オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド合成装置の使用により得た。1オリゴヌクレオチドは17merであり、第2は31merヌクレオチドであった。2オリゴヌクレオチドをアニールし、 $\beta$ TCFリーダープепチドの最後のアミノ酸をエンコードするDNA配列およびオンコスタチンMの初めの31個のアミノ酸をエンコードするDNA配列の融合に用いた。



d.  $pSV2\beta$ OncMの連結および分離

三方連結を行ないそれにより  $pSV2\beta$ TCFのNaeI-EcoRIフラグメント、 $pSV2$

ター配列をオンコスタチンMコーディング領域に融合させた。これは数段階で達成された。

a.  $pSV2\beta$ TCFのNaeI-EcoRIフラグメントの調製

プラスミド  $pSV2\beta$ TCFをEcoRIおよびNaeIで消化した。NaeI部位は $\beta$ TCF前駆物質の第1アミノ酸の14ヌクレオチド上流である。この処理は全前駆物質および成熟 $\beta$ TCFコーディング領域を除去する。消化したフラグメントをゲル分離により分離した。

b.  $pSV2$ OncMの2kbEcoRI-BglIIフラグメントの調製

$pSV2$ OncMをEcoRIおよびBglIIで消化した。フラグメントを1MPアガロースゲル上の分離により分離した。2kbフラグメントは  $pSV2$ ポリアデニル化シグナルの部分およびオンコスタチンMのコーディング領域の部分すなわちオンコスタチンMの第1アミノ酸からB521部位まで、を有した。

c. 合成オリゴヌクレオチドの調製

OncMのEcoRI-BglIIフラグメント並びに5'端にBglIIオーバーハングおよび3'端にNaeI部位を有する二本鎖合成オリゴヌクレオチド片を連結した。生じたプラスミドは  $pSV2\beta$ OncMと称した。そのプラスミドはオンコスタチンMをエンコードするDNA配列に融合した $\beta$ TCFリーダークリー配列をエンコードするDNA配列を有する。 $\beta$ OncMコーディング領域を配列決定し、所望配向に融合する、すなわち $\beta$ TCFのリーダークリー配列の最後のアミノ酸が成熟オンコスタチンMの第1アラニンに融合したことを示した。

G. 組織系オンコスタチンMの調製

(1) COS細胞の調製

a. オンコスタチンM遺伝子のサブクローニング : pBSM/ $\beta$ OncMの調製

pBSM/ $\beta$ OncMプラスミドの構築を3段階で行なった。第1段階は発現ベクターpBSM中クローニング部位の調製であった。これはポリリンカー中のXhoI部位における切断、次にDNA

リメラーゼIのクレノウフラグメントによる末端のブランチ化により行なった。線状化プラスミドを次いでHindIII部位でXhoI部位に対する32塩基対5'を切断し、アガロースゲル電気泳動により精製した。第2段階は前記プラスミド  $pSV2\beta$ OncMからオンコスタチンMコーディング配列に融合した $\beta$ TCFリーダークリー配列を含むフラグメントを分離することであった。これは遺伝子に対する丁度3'のポリリンカー中のBamHI部位で切断し、末端をDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントでブランチにし、次にポリリンカー中の遺伝子の5'端においてHindIII部位で切断することにより行なった。フラグメントはアガロースゲル電気泳動により精製した。構築の最後の段階はこのHindIII-BamHI

(ブランチ)フラグメントをベクターのHindIII-XhoI (ブランチ)中へ挿入することであった。

b. pBSM/ $\beta$ OncMのCOS細胞中へのトランスフェクション

COS細胞【グルズマン(Gluzman)、セル(Cell)

## 特開昭64-63395 (32)

(1981) 23:175~182) を用い胎仔血清10%, ストレプトマイシン10  $\mu$ g/ml およびペニシリン100単位/mlを有するダルベッコ (Dulbecco) 改変イーグル培地 (DMEM) 中で37℃で、5% CO<sub>2</sub>を含む増殖雰囲気中に維持した。

トランスフェクションのために、COS細胞を60または100mm組織培養皿中へ50%全面成長を達成する密度に播布し、前記のように18~20時間培養した。トランスフェクションの直前に培地を無血清ヌセラム (Nusepum) (コラボラティブ・リサーチ (Collaborative Research)) 10%およびクロロキシエリン酸塩100mMを含むDMEMで置換した。PBS中にDNA 167  $\mu$ g/ml およびDEAEデキストラン10mg/mlを含むトランスフェクション反応液を次いで細胞培地に加えて10  $\mu$ g/mlの最終DNA濃度を考え、37℃でインキュベートした。2~3時間後にトランスフェクション培地を除き、DMEM 10%を含むPBS中で室温で2分間置換

次の段階においてプラスミドpSV2dhfrをNde I-Pvu IIで消化し、4kbフラグメントをゲル精製した。最後の段階においてPvu II-Nde Iで切断したpSV2dhfrをNde I-Eco RIプラントpSV2On cMまたはpSV2  $\beta$  On cMフラグメントのいずれかに連結させた。  
b. pSV2On cM/dhfrまたはpSV2  $\beta$  On cM/dhfrによるdhfr<sup>-</sup>CHO細胞のトランスフェクション

プラスミドpSV2On cM/dhfrまたはpSV2  $\beta$  On cM/dhfrをリン酸カルシウム法によりCHO細胞中へトランスフェクションした。細胞をメトトレキサートの増加濃度の存在下に増殖させると遺伝子の増幅が生じ(ガサー (Gasser) ほか、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) (1981) 256:16938~16946参照)、次いでA375細胞の増殖の阻止の測定によりオンコスタチンM発現について検定する。

c. オンコスタチンM遺伝子のサブクローニング

した。次いで細胞をDMEM中で2回洗浄し、PBS 10%を有するDMEM中で37℃でインキュベートした。18~20時間後に培地を血清不含DMEMに変えた。次いで細胞を37℃で48時間インキュベートした。培地を回収し、遠心分離により精製して細胞破片を除き、次にさらに精製することなく増殖阻止検定で試験した(実施例1B参照)。

## 例 C.H.O.検定

a. pSV2On cM/dhfrおよびpSV2  $\beta$  On cM/dhfrの調製

ヒトオンコスタチンM遺伝子およびオンコスタチンM遺伝子に融合した $\beta$ TCFリーダ配列、マウスdhfr遺伝子並びにSV40プロモーターおよび分在SV40配列を含むpSV2  $\beta$  On cM/dhfr、並びに $\beta$ TCFリーダ配列を欠くpSV2On cM/dhfrを次のように構築した。第1段階においてpSV2On cMまたはpSV2  $\beta$  On cMのNde I-Eco RI (プラント) を得た。2.3~2.6kbフラグメントをゲル精製した。

1. プラスミドpSV2DR/ $\beta$ On cMの調製

前記COS細胞中の過剰発現オンコスタチンMに対して示したこの構造物を用いてdhfr欠失チャイニーズハムスター卵巣細胞(アローブ (Urbau) ほか、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA (1980) 77:4216~4220) を形質転換する。

プラスミドpSV2DR/ $\beta$ On cMはプラスミドpH3M/ $\beta$ On cMの $\beta$ -オンコスタチンM転写単位(実施例9A例)をプラスミドpSV2/dhfr中へ挿入することにより構築した。プラスミドは3段階で構築した。第1に、プラスミドpH3M/ $\beta$ On cMをCMVエンハンサー領域に対する15'のNro I部位で、およびオンコスタチンM遺伝子に対するポリアダプシユル化および転写終止シグナルに対するBam HI部位3'で切断した。生じたフラグメントをアガロースゲル電気泳動により精製した。第2段階において、プラスミドpSV2/dhfrをマウスジヒドロ葉酸レダク



## 特開昭54-63395 (39)

ターゼ遺伝子に対するポリアデニル化および転写誘導シグナルに対するBamHI部位8'で切断した。第3段階はNruI-BamHIオンコスタチンM遺伝子含有フラグメントを、初めてDNAフラグメントをそれらBamHI端で結合させ、次いで融合BamHIオーバーハングをクレンワンプラントにすることによりベクタープラスミドpSV2/dhfrのBamHI部位中へ挿入することであった。最終プラントエンド連結するとプラスミドpSVDR/OnoMを生じた。

## 実施例10

## 昆虫細胞中に発現されたオンコスタチンM

## A. ベクターのクローニングおよび発現の説明

(1) プラスミドpAc610 (スミス (Smith) ほか、モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.) (1983) 12: 2158 ~ 2165) は昆虫細胞中の異質遺伝子の発現を可能にする。

## B. 組換えオンコスタチンM遺伝子の調製

(1) プラスミドpAc/OnoMの調製

## (1) 519細胞のpAc/OnoMによるトランスフェクション

プラスミドpAc/OnoMをAcNPV野性型バクテリオウイルスDNAとともに519昆虫細胞 (スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda)) 中へ同時トランスフェクションした。トランスフェクション体をブランク検定において吸着陰性 (occlusionnegative) 変異型に於いてスクリーニングした。1吸着陰性ブランクを分離し、5回の連続ブランク増殖後、高力価組換えウイルス株が調製された。トランスフェクションの48時間後に感染細胞から得た上澄みをオンコスタチンM活性について検定した。

## 実施例11

## オンコスタチンMの生物活性

## A. 増殖阻止活性

組換えオンコスタチンMの生物活性を増殖阻止検定により評価した。簡単に記載すると、形質転換細胞の抽出物または細胞培養の培地の一定部分を阻体タンパク質としてのウシ血清アルブミン

このプラスミドを昆虫細胞、スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) (sf9) 中へトランスフェクションするとオンコスタチンMをバクテリオウイルスポリヘドリン遺伝子レギュレーターの制御下に発現させることを可能にする。

a. BamHI消化pAc610の調製

プラスミドpAc610をBamHIで消化した。

b. オンコスタチンM遺伝子のBamHI-BamHIフラグメントの調製

pOnoMV2をBamHIで消化し、100bpフラグメントをゲル精製した。

c. pAc/OnoMの連結および分離

BamHI消化pAc610とオンコスタチンM遺伝子を含むpOnoMV2の100bpBamHIフラグメントとをDNAリガーゼを用いて連結し、形質転換体を制限分析によりスクリーニングした。正しい構築体を分離し、pAc/OnoMと呼称した。

c. 組換えオンコスタチンMの調製

20μgとともに凍結乾燥し、耳びうし胎仔血清10%を含むDMEM中に懸濁し、希釈希釈した後4875細胞 (3.5×10<sup>5</sup> 細胞/ウエル) を含む96ウエル培養皿に加えた。細胞を37℃で72時間増殖させ、シュガーマン (Sugarman) ほか、カンサー・リサーチ (Cancer Research) (1987) 47: 780 ~ 786により記載されたようにクリスタルバイオレットによる染色により比増殖について分析した。590nmにおける結合染料の吸光度をマイクロタイタープレートリーダー (ジネティック・システムズ (Genetic Systems, Seattle, WA) 製) で測定した。組換えオンコスタチンMは次の発現系を用いて調製した：大腸菌 (E. coli)、COS細胞および昆虫細胞 (sf9)。データは次表に要約される。



## 特開昭64-63395 (35)

より、因子の組合せが相乗的に作用できるので個々の組成物の實質的に低濃度を用い、なお成長抑制効果を維持することができることもまた明らかである。殊に、オンコスタチンM、TCF- $\beta$ 、 $\gamma$ -インターフェロン、または腫瘍壊死因子の投与量が単独に用いたときに抑制を完全に阻止できない場合に、オンコスタチンMおよび少くとも1種の他の成長調節因子を、それらの効果を加えても阻止を与えるのに必要であるよりは低い濃度で組合せて増殖の實質的に大きい阻止を達成することができる。組合せは生体内および試験管内の両方で、例えば培養、ロイコフオレシス (leukopoiesis)、生体内の予防および治療目的などに対し細胞増殖の調節に使用することができる。

殊に、オンコスタチンMは生物活性を有する因子を自己骨髄移植に対する細胞の処置に使用できる。因子の使用は骨髄中の腫瘍細胞の増殖を阻止し、またコロニー細胞形成を刺激することができる。オンコスタチンMはまた上皮細胞の増殖を刺激し、それにより創傷治癒を促進するために使用

できる。さらに、オンコスタチンおよびそのフラグメントを免疫原として抗体形成の誘発に用いることができる。開発された抗体は体液中に存在するオンコスタチンMのタイター、またはそれに対する結合による因子の惰性の修飾に対する使用が見出される。さらに、抗体並びに糖基オンコスタチンMまたはそのフラグメントは診断キットの成分として他の試薬、殊に抗体とともにオンコスタチンMの検出および定量に役立つ。

オンコスタチンM mRNAに相補性の配列を含むプローブを試料中のオンコスタチンM mRNAの存在および量の決定に使用でき、それはさらに癌細胞の存在の検出に使用できる。オンコスタチンMおよび関連ペプチドを結合する細胞表面受容体はオンコスタチンMおよび類似物質に対する細胞の感受性の予測、並びにオンコスタチンMは生物活性を有する他のペプチドをスクリーニングする手段に用いることができる。

本明細書にあげた刊行物および特許出願はすべて本発明に関係する当業者の技術水準の指標であ

る。刊行物および特許出願はすべて個々の刊行物および特許出願が特定的および個々に参照すべく示されたと同じ範囲に参照される。

次の生物体はイン・ビトロ・インターナショナル (In Vitro International, 0.11 P Hamonds Perry Road, Linthicum, Maryland, 21090) に寄託された：プラスミド pB M11/NDP/On c Mを含む大腸菌 (E. coli) HB101、登録番号IV1-10157、1988年1月14日寄託。

前記発明は例示および理解を明確にするための例として若干詳細に記載されたけれども、一定の変更および改変を特許請求の範囲の範囲内で実施できることは明らかであろう。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図はオンコスタチンMで処理した細胞の連続の顕微鏡写真であり、(A~D) はそれぞれ0.5および1000 IU単位で処理したA375黒色腫細胞であり、(E~F) はそれぞれ0.5および1000 IU単位で処理したW126細胞芽

細胞であり、

第2図はオンコスタチンMのSDS-PAGE分析の写真であり、

第3図はオンコスタチンM cDNAクローン On c M 46の全配列であり、

第4図はTPA処理および非処理U937細胞並びにPHA刺激正常T細胞中のポリ(A<sup>+</sup>) RNAのノーザンブロット分析の写真である。

特開昭64-63395 (38)

図面の符号の説明(単位はmm)

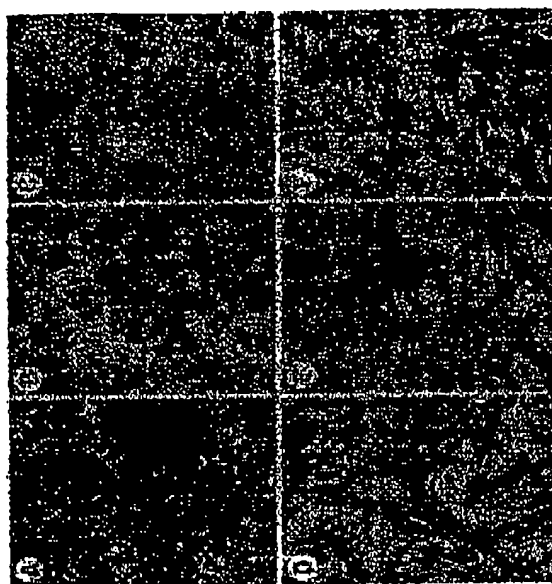


FIG. 1

FIG. 2

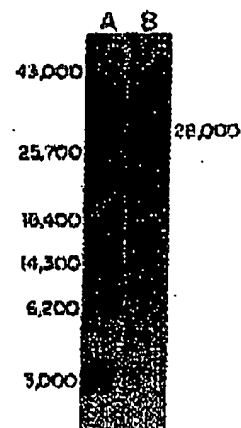
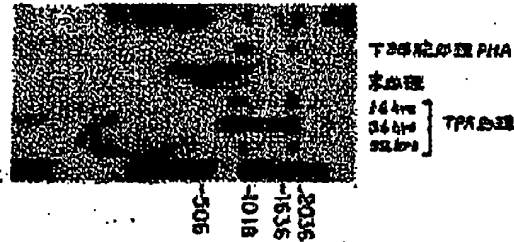


FIG. 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

特開昭64-63385 (37)

FIG.4



第1頁の続き

①Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 13/00 15/04		8318-4H
C 12 N 15/00		A-8412-4B C-8412-4B D-6712-4B A-7908-2G
C 12 P 21/00		
// G 01 N 33/53		
(C 12 P 21/02)		
(C 12 R 1:19)		
(C 12 P 21/02)		
(C 12 R 1:19)		
C 07 K 99:00		

優先権主張 ①1987年10月30日②米国(U S)③115139

④1988年1月15日⑤米国(U S)⑥144574

⑦発明者	ハンス マーカード	アメリカ合衆国 ワシントン州 98040 マーサーイズ サウスイースト フォーティシックス ストリート 9222
⑧発明者	トーマス ジェイ ブ ラウン	アメリカ合衆国 ワシントン州 98107 シアトル ノー スウエスト サーティシックス アベニュー 6121
⑨発明者	ナジマ マーリック	アメリカ合衆国 ワシントン州 98199 シアトル ウエ ストモント ウェイ ウェスト 2405
⑩発明者	テイモシー エム ロ ーズ	アメリカ合衆国 ワシントン州 98106 シアトル ノー スイースト ファイフティナイン ストリート 328
⑪発明者	チャ マー ウェイ	アメリカ合衆国 ワシントン州 98005 ベルグヴィー ノースイースト サーティフォース プレイス 13950

Fulbright (NY) 様 ←S.KITAMURAPATENTOFFI 06-6375-1620

2004年 9月 28(木) 10:20 P039

特開昭64-63395 (88)

手続補正書(方式)

手続補正書(方式)

昭和 63.8.13  
年 月 日昭和 年 月 日  
63.8.23

特許庁長官 小川 邦夫 殿

特許庁長官 殿

1. 事件の表示 昭和63年特許第109880号

1. 事件の表示 昭和63年特許第109880号

2. 発明の名称 オンコスタンMおよび抗腫瘍活性を有する新規組成物

2. 発明の名称 オンコスタンMおよび抗腫瘍活性を有する新規組成物

3. 補正をする者  
事件との関係 出願人3. 補正をする者  
事件との関係 出願人

名称(氏名) オンコーゲン

名称(氏名) オンコーゲン

4. 代理人  
住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号  
氏名 (5895) 井理士 中 村4. 代理人  
住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号  
氏名 (5895) 井理士 中 村

5. 補正命令の日付 自 発

5. 補正命令の日付 昭和63年7月28日

6. 補正の対象 明細書

6. 補正の対象 明細書の出願人の署名、代理人の署名、  
発明の名称、及び図面7. 補正の内容 明細のとおり  
願書に最初に添付した明細書の写し(内容に変更なし)

7. 補正の内容

(1) 願書、代理権を証明する書面及び図面の写し  
(内容に変更なし)は別紙のとおり。(2) 昭和63年8月13日付提出の手続補正書  
(方式)に添付の明細書の第137頁第18行  
から同第17行目の「……細胞の一流の顕微鏡  
写真であり、……」を「……細胞(生物の形態)  
の一流の顕微鏡写真であり、……」と訂正する。

特開昭64-63395

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成8年(1996)8月27日

【公開番号】特開平1-63395

【公開日】平成1年(1989)3月9日

【年続号数】公開特許公報1-634

【出願番号】特願昭63-109820

【国際特許分類第6版】

C12P 21/02

C12N 1/21

3/10

13/09 ZNA

//C12P 21/02

C12R 1:91 )

(C12P 21/02

C12R 1:19 )

【F I】

C12P 21/02 H 9282-4B

C12N 1/21 8828-4B

15/00 ZNA A 9281-4B

5/00 B 7729-4B

予 結 結 正 書

平成1年1月1日

特許庁長官 岡 島 孝 敏

1.事件の由来 昭和63年特許第109820号

2.発明の名称 オンコステチンMおよび抗腫瘍活性を有する  
新規組成物

3.修正をする者

事件との関係 出 願 人

名称(氏名) オ ン コ ス テ チ ン

4.代理人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目8番1号

電話(代) 03-4711-4711

氏 名 (FBI) 弁護士 中 村 敏

5.修正の旨の目付 日 期

6.【本修正により特許請求の範囲に追加された発明の数は合計18  
となりました。】

7.修正の対象 特許請求の範囲の図

8.修正の内容 特許請求の範囲

特許請求の範囲

(1) ポリペプチドを製造する方法であって、ポリペプチドがオンコステチンM  
あり、次のアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含む、

Met Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser Iys Gly Tyr Arg Val Leu Leu Gly  
 Glu Leu Glu Lys Glu Val Asp Lys Met Glu Asp Thr Ser Arg Leu Leu  
 Asp Pro Tyr Ile Asp Ile Glu Gly Leu Asp Val Pro Lys Leu Arg Gly  
 His Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala Pro Pro Gly Gln Glu Tyr Leu Arg  
 Gly Leu Gly Arg Arg Gly Tyr Leu Glu Thr Leu Ala Ala Thr Leu Gly  
 Cys Val Leu His Arg Leu Ala Asp Leu Glu Glu Arg Leu Pro Lys Ala  
 Glu Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu Arg Met Glu Asp Leu Glu Lys Arg  
 Glu Met Ala Arg Pro Ala Ile Leu Gly Leu Arg Ala Met Ile Tyr Glu  
 Met Ala Glu Leu Lys Arg Arg Ser Asp Thr Ala Glu Pro Thr Lys Ala  
 Gly Arg Gly Ala Pro Glu Pro Pro Thr Pro Val Ser Ala Ser Arg Ala  
 Thr Glu Arg Lys Leu Gly Gly Cys Arg Glu Leu Thr Gly Tyr Ile Arg  
 Thr Met Thr Ser Val Gly Arg Val Thr Ser Lys Tyr Gly Glu Ser Pro  
 Ala Arg Ser Arg Arg His Ser Pro Glu Ala Leu Arg Lys Gly Val  
 Arg Ala Thr Arg Pro Ser Arg Lys Gly Lys Arg Leu Met Thr Arg Gly  
 Glu Leu Thr Arg

(2) ポリペプチドを固相担体上に合成する工程、及び合成したポリペプチドを  
固相担体から切り出す工程、又は

(3) 以下の方向に、書式により記載される配列配列番号及び配列配列番号、ポ  
 リペプチドをコードするDNA配列であって、天然系から分離された又は又は  
 部分遺伝子、あるいは合成遺伝子であるDNA配列、並びに宿主により  
 転写される配列及び転写産物を含有、DNAの配列の転写が開始及び終  
 断された両面配列下であり、開始及び終断領域の少なくとも1つのDNAの  
 配列が天然系から分離される場合オンコステチンMの遺伝子に結合した

特開昭64-83385

天然存在以外である核酸塩基を含む核酸塩基の塩基となる工程、及び塩基  
したポリヌクレオチドを合成する工程、

を含む方法、

(1) 次のアミノ酸配列をコードするDNA配列、

Met Ala Ala Tyr Gly Ser Cys Ser Tyr Gly Tyr Arg Val Leu Leu Gly  
Gln Leu Gln Lys Gln Thr Asp Val Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu  
Asp Trp Tyr Ile Asp Phe Gln Gly Lys Arg Val Pro Lys Leu Arg Gln  
His Cys Arg Gln Arg Val Gly Ala Ser Pro Ser Gln Gln Thr Leu Arg  
Gly Leu Gly Arg Arg Gly Phe Lys Gln Thr Lys Asp Ala Thr Leu Gly  
Cys Val Leu His Arg Leu Ala Arg Leu Gln Gln Arg Leu Pro Lys Ala  
Gln Asp Leu Gln Arg Ser Gly Leu Ala Met Gln Asp Leu Gln Lys Leu  
Gln Met Ala Arg Pro Ala Ile Leu Gly Leu Arg Asp Ala Ile Tyr Cys  
Met Ala Gln Leu Leu Asp Ala Ser Asp Thr Ala Gln Pro Thr Lys Ala  
Gly Arg Gly Ala Ser Gln Ser Pro Thr Thr Thr Pro Ala Ser Arg Ala  
Phe Gln Ala Lys Leu Gln Gly Cys Arg Pro Leu His Gly Tyr His Arg  
Phe Met Thr Ser Val Gly Arg Val His Ser Lys Tyr Gly Gln Ser Pro  
Asn Arg Ser Arg Arg Phe Ser Pro His Gln Ala Leu Asn Lys Gly Val  
Arg Ala Thr Asn Pro Ser Arg Lys Gly Lys Arg Leu Met Thr Arg Gly  
Gln Leu Pro Arg

(2) 次の配列を有するDNA配列、

ATG GCG GGT ATG GCG AGC TGG TCG AAA GAG TAC GCG GTC GTC GTT GCG CAG  
CTC CAG GAG CAG AGC GAT CTC ATG CAG GAC ACC AGC AGA CTC CTC GAG GCG  
TGT ATA GGT GTC CAG GCG CTC GAT GTT CTT AAA CTG AGA GAG CAC TGC AGC  
GAG GCG GCG GCG GCG GCG TTC GCG AGT GAG GAG ACC CTC AGC GCG CTC GCG AGC  
GCG GCG TTG CTC GAG AGC GTC GAT GCG AGA CTC GCG TCG GTC CTC GAG AGA  
CTG GCG GAG TTA GCG CAG GCG CTC GCG AGC AGC GCG GAG GAT TTC GAG AGC TGT  
GCG TTA AAG ATG GCG GCG TTC GAG AGC GTC CAG ATG GCG AGC GCG AGC AGC  
CTG GCG CTC AGC AGC AGC AGC AGC TGA TGC TGC AGC GCG CAG CTC CTC CAG AGC TGA  
CAG AGC GGT GAG GCG AGC AGC GGT GCG GCG GCG GCG TGT CAG GCG GCG AGC  
GCG AGC GGT GCG TCG GAT GGT TTT CAG GCG AGC GTC GAG GCG TCG AGC TTA  
CTG GAT GCG TGA GAT GCG TTA AGC CAG TGA CTC GCG GCG GTC TTA AGC AGC  
TTC GCG CAG AGC GCG AGC GCG AGC GCG AGC CAG AGC GCG CAG GCG GTC  
AGC AGC GCG GTC GCG AGC AGC AGC GCG TCG AGC AAA GCG AGC AGC AGC GTC AGC  
AGC AGC GCG CAG GTC GCG GCG

(3) 前記DNA配列のDNA配列を含むプラスミド、

(4) プラスミドがpBM11/NDP/0.0001である請求項(3)記載のプラスミド、

(5) 請求項(4)又は請求項(3)記載のプラスミドを含む、形質転換した宿主細胞、

(6) 宿主細胞が菌体細胞又は真核細胞である、請求項(5)記載の形質転換した宿主細胞、

(7) 宿主細胞が菌体又は真核細胞の細胞である、請求項(6)記載の形質転換した宿主細胞、

(8) 宿主細胞が大腸菌である、請求項(7)記載の形質転換した宿主細胞、



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**